



# **Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

**Universidad del Perú. Decana de América**

**Facultad de Medicina Veterinaria**

**Escuela Profesional de Medicina Veterinaria**

## **Detección de genes de virulencia asociados a toxinas en aislados de *Staphylococcus pseudintermedius* de piodermas y otitis caninas**

### **TESIS**

**Para optar el Título Profesional de Médico Veterinario**

### **AUTOR**

**Néstor Lee Brayan RIVAS ROSALES**

### **ASESOR**

**Juan José SIUCE MORENO**

**Lima, Perú**

**2020**



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

## Referencia bibliográfica

---

Rivas N. Detección de genes de virulencia asociados a toxinas en aislados de *Staphylococcus pseudintermedius* de piodermas y otitis caninas [Tesis]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, Escuela Profesional de Medicina Veterinaria; 2020.

---

## HOJA DE METADATOS COMPLEMENTARIOS

Código ORCID del autor	<a href="https://orcid.org/0000-0001-9093-463X">https://orcid.org/0000-0001-9093-463X</a>
DNI o pasaporte del autor	47557658
Código ORCID del asesor	<a href="https://orcid.org/0000-0002-9673-7853">https://orcid.org/0000-0002-9673-7853</a>
DNI o pasaporte del asesor	42807429
Grupo de investigación	MICROBIOLOGÍA APLICADA A LA SALUD PÚBLICA-ANIMAL Y DE IMPACTO AMBIENTAL (MASPAIA)
Agencia financiadora	Vicerrectorado de Investigación y Posgrado (UNMSM)
Ubicación geográfica donde se desarrolló la investigación	Av. Circunvalación 2800, San Borja, Lima-Perú (-12.080729, -76.987032)
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2019-2020
Disciplinas OCDE	4.03.01 -- Ciencia veterinaria



**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS EN MODALIDAD VIRTUAL  
PARA OPTAR EL TÍTULO DE MEDICO VETERINARIO  
Autorizado por R.D N° 304-D-FMV-2020**

**1. FECHA DE LA SUSTENTACIÓN 26/08/2020**

HORA INICIO: 11:30

HORA TÉRMINO: 12.45

**2. MIEMBROS DEL JURADO**

PRESIDENTE: **Blgo. Mg. Sonia Yenny Calle Espinoza**

MIEMBRO: **MV. Esp. Diego Díaz Coahila**

MIEMBRO: **MV. Ysaac Rubén Chipayo Gonzáles**

ASESOR **MV. Mg. Juan José, Siuce Moreno**

**3. DATOS DEL TESISISTA**

APELLIDOS Y NOMBRES: **RIVAS ROSALES, NÉSTOR LEE BRAYAN**

CÓDIGO: 14080038

R.R. DE GRADO DE TESISISTA NÚMERO: **N° 013736-2020-R/UNMSM**

TÍTULO DE LA TESIS: **“DETECCIÓN DE GENES DE VIRULENCIA ASOCIADOS A TOXINAS EN AISLADOS DE *Staphylococcus pseudintermedius* DE PIODERMAS Y OTITIS CANINAS”**

**4. RECOMENDACIONES**

---

**Datos de la plataforma virtual institucional del acto de sustentación:**

<https://meet.google.com/qjf-tnio-oyh>, <https://meet.google.com/fhn-yhfh-msk>

ID:


Grabación archivada en: MEET GOOGLE


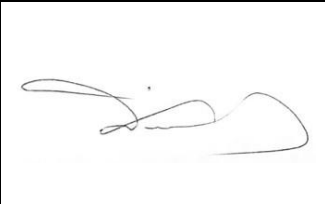

**5. NOTA OBTENIDA: 18 (en números), dieciocho (en letras)**

**6. PÚBLICO ASISTENTE:** (Nombre, apellido y DNI)

Apellidos y Nombres	DNI	Correo electrónico
Alvarez Vega, Luis	71419745	alvarezvega.luisguillermo@gmail.com
Palomino Farfán, Joel	46238101	mv.joel9607@gmail.com
Gonzales Magallanes, Sofía	75200383	sofia.gonzales1@unmsm.edu.pe
Cruz Calixto, Emelin	76287759	emelinvet5@gmail.com
Cayo Rodríguez, Samantha	74078280	samantha.cayo@unmsm.edu.pe
Muñoz Huamán, Christy	72185746	christymunoz229@gmail.com
Bocanegra Dediós, William	43777168	bocanegrawvet@gmail.com

**7. FIRMAS DE LOS MIEMBROS DEL JURADO**


<b>Blgo. Mg Sonia Yenny Calle Espinoza</b>
<b>PRESIDENTE</b>

		
<b>MV. Mg. Juan José, Siuce Moreno</b>	<b>MV. Esp. Diego Díaz Coahila</b>	<b>MV. Ysaac Rubén Chipayo Gonzáles</b>
<b>Apellidos y Nombres</b>	<b>Apellidos y Nombres</b>	<b>Apellidos y Nombres</b>
<b>ASESOR DE LA TESIS</b>	<b>MIEMBRO JURADO</b>	<b>MIEMBRO JURADO</b>

## **DEDICATORIA**

Dedico este trabajo con mucho amor a mis padres José y Gina, quienes han sido el motor de mi vida durante estos largos años de estudio, su esfuerzo, amor, comprensión y el apoyo incondicional, hacen que hoy pueda conseguir este logro para mi vida.

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Juan Siuce por brindarme la oportunidad de poder desarrollar esta tesis bajo su asesoría y la preocupación siempre por que el desarrollo de ésta sea de la mejor manera.

A Luis Alvarez, quien desde el inicio me ayudo con la formulación del proyecto y compartió sus conocimientos que me sirvieron para la realización de la tesis.

A mis amigos del Laboratorio de Bacteriología: Joel, Sofi, Fernando, Roger por la ayuda que me ofrecieron y fue de mucha importancia para el desarrollo de este estudio, además de la gran amistad brindada y que siempre quedará marcada.

El presente estudio fue desarrollado gracias al financiamiento del Vicerrectorado de Investigación y Posgrado, como parte del proyecto “Detección genética del potencial patogénico y resistencia a antibióticos de *Staphylococcus pseudintermedius* aislados de otitis y piodermas de caninos domésticos con código A19080891.





## ÍNDICE DE CONTENIDO

DEDICATORIA .....	2
AGRADECIMIENTOS .....	3
RESUMEN .....	6
ABSTRACT .....	7
LISTA DE CUADROS.....	8
LISTA DE FIGURAS.....	9
I.INTRODUCCIÓN.....	10
II.REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....	14
2.1 Generalidades.....	14
2.1.1 Pioderma canina .....	14
2.1.2 Otitis externa canina .....	19
2.1.3 Género <i>Staphylococcus</i> .....	21
2.1.3.1 <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> .....	24
2.1.3.2 Factores de Virulencia .....	25
2.1.3.3 Toxinas asociadas a <i>S. pseudintermedius</i> .....	27
2.1.3.4 Regulación de los factores que determinan la virulencia .....	31
2.1.3.5 Islas de Patogenicidad .....	32
2.2 Identificación molecular de <i>S. pseudintermedius</i> .....	34
2.2.1 Reacción en cadena de la Polimerasa .....	34
2.2.2 PCR-RFLP .....	34
2.3 PCR-Múltiple.....	35
III. MATERIALES Y MÉTODOS .....	37
3.1 Lugar de ejecución y periodo de duración.....	37
3.2 Descripción del material experimental .....	37
3.3 Materiales y equipos .....	38
3.3.1 Material Biológico .....	38
3.3.2 Materiales y equipos de laboratorio.....	38
3.3.3 Reactivos .....	39
3.3.4 Programas Informáticos.....	39
3.4 Metodología .....	39

3.4.1 Reactivación de los aislados .....	39
3.4.2 Extracción del ADN .....	40
3.4.3 Reacción en cadena de la polimerasa múltiple .....	40
3.4.3.1 Desarrollo del protocolo de la PCR-Múltiple.....	41
3.4.4 Electroforesis .....	48
3.4.5 Secuenciamiento de los productos amplificados de <i>S. pseudintermedius</i> positivos a los genes de virulencia asociados a toxinas <i>siet</i> , <i>lukS</i> y <i>lukF</i> .....	51
IV. RESULTADOS .....	52
V. DISCUSIÓN .....	57
VI. CONCLUSIONES.....	62
VII. LITERATURA CITADA.....	63
ANEXOS .....	71
ANEXO 1 .....	71
Reactivación y extracción de ADN.....	71
ANEXO 2 .....	74
Resultados de la detección de genes de virulencia asociados a toxinas mediante PCR-Múltiple de los aislados de piodermas del año 2016 .....	74
ANEXO 3 .....	75
Resultados de la detección de genes de virulencia asociados a toxinas mediante PCR-Múltiple de los aislados de piodermas del año 2017 .....	75
ANEXO 4 .....	76
Resultados de la detección de genes de virulencia asociados a toxinas mediante PCR-Múltiple de los aislados de piodermas del año 2018 .....	76
ANEXO 5 .....	77
Resultados de la detección de genes de virulencia asociados a toxinas mediante PCR-Múltiple de los aislados de otitis externas del año 2018.....	77
ANEXO 6 .....	78
Alineamiento del producto amplificado del gen <i>siet</i> .....	78
ANEXO 7 .....	80
Alineamiento del producto amplificado del gen <i>lukS</i> .....	80
ANEXO 8 .....	82
Alineamiento del producto amplificado del gen <i>lukF</i> .....	82

## RESUMEN

Las piodermas y otitis externas en perros son enfermedades multifactoriales que afectan con mayor frecuencia a esta especie, y representan la gran mayoría de los problemas dermatológicos en la práctica clínica veterinaria. *Staphylococcus pseudintermedius* es el agente más importante asociado a la pioderma canina. Dicho agente bacteriano produce toxinas estafilocócicas que se clasifican en tres grupos principales: superantígenos de toxina pirogénica (PTSAgs), que comprenden la toxina del síndrome de shock tóxico (TSST) codificada por el gen *tst*, las enterotoxinas estafilocócicas (SE); toxinas exfoliativas codificadas por el gen *siet*; y el tercer grupo compuesto por las citotoxinas tales como leucocidinas codificadas por el gen *luk-I* (*lukS*, *lukF*) y hemolisinas, responsables de lesiones cutáneas graves y lisis celular de los polimorfonucleares. Además, existe evidencia de la transmisión de *S. pseudintermedius* entre humanos y perros. Sin embargo, no se conocen las características virulentas de los aislados circulantes en nuestro país. Por ello, el objetivo del presente estudio buscó determinar el perfil patogénico genético asociado a toxinas de *S. pseudintermedius*. Así, se evaluaron 141 aislados identificados genéticamente como *S. pseudintermedius* provenientes del cepario del Laboratorio de Microbiología y Parasitología Veterinaria de la FMV-UNMSM, durante el 2016-2018, de aislados obtenidos de casos clínicos de caninos con diagnóstico de piodermas y otitis externas. Se realizó en primer lugar la reactivación de las cepas, seguido de la extracción del ADN, y la posterior detección de los genes de virulencia asociados a toxinas *tst*, *siet*, *lukS*, *lukF* mediante PCR-Múltiple. Obteniendo que el 98.58% de los aislados de muestras clínicas de piodermas y otitis externas contienen tres genes de virulencia asociados a toxinas *siet*, *lukS* y *lukF*. Consecuentemente existe un potencial patogénico genético asociado a toxinas de estas cepas de *S. pseudintermedius*, que podrían agravar la infección y resolución de estos cuadros dermatológicos en caninos y además de impacto en la salud pública.

**Palabras claves:** pioderma, caninos, *Staphylococcus pseudintermedius*, toxinas

## ABSTRACT

Pyodermas and external otitis are the most frequently multifactorial diseases in dogs, both are considered the most common dermatological problems in veterinary clinical practice. *Staphylococcus pseudintermedius* is the most important agent associated with canine pyoderma. This bacterial agent produces staphylococcal toxins that are classified into three main groups: pyrogenic toxin superantigens (PTSAGs), which comprise the toxic shock syndrome toxin (TSST) encoded by the *tst* gene, staphylococcal enterotoxins (SE); exfoliative toxins encoded by the *siet* gene; and the third group consisting of cytotoxins such as leucocidines encoded by the *luk-I* gene (*lukS*, *lukF*) and hemolysins, responsible for severe skin lesions and cell lysis of polymorphonuclear cells. In addition, there is evidence of the transmission of *S. pseudintermedius* between humans and dogs. However, the virulent characteristics of circulating isolates in our country are not known. Therefore, the aim of the present study was to determine the genetic pathogenic profile of toxins of *S. pseudintermedius*. Thus, 141 genetically identified isolates such as *S. pseudintermedius* from the collection strains of the Laboratory of Microbiology and Veterinary Parasitology of the FMV-UNMSM were evaluated during 2016-2018, from isolates obtained from clinical cases of canines diagnosed with pyoderma and external otitis. The reactivation of the strains was first performed, followed by DNA extraction, and the subsequent detection of virulence genes associated with *tst*, *siet*, *lukS*, *lukF* toxins by PCR-Multiple. Obtaining that 98.58% of isolates from clinical samples of pyoderma and otitis externa contain three virulence genes associated with toxins *siet*, *lukS* y *lukF*. Therefore, there is a genetic pathogenic potential associated with toxins of these strains of *S. pseudintermedius*, which can aggravate the infection and resolution of these dermatological conditions in canines on public health.

**Keywords:** pyoderma, canines, *Staphylococcus pseudintermedius*, toxins

## LISTA DE CUADROS

**Cuadro 1.** Principales factores de virulencia de *Staphylococcus pseudintermedius* en medicina veterinaria y su mecanismo de acción

**Cuadro 2.** Secuencia de cebadores para los genes *tst*, *siet*, *lukS* y *lukF*

**Cuadro 3.** Mix para una reacción de PCR-Múltiple

**Cuadro 4.** Condiciones de ciclos térmicos de la PCR-Múltiple

**Cuadro 5.** Condiciones de la corrida electroforética

**Cuadro 6.** Distribución de los genes asociados a toxinas en aislados de *S. pseudintermedius* en dos sitios de infección

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Erupción papular, pústulas interfoliculares y costras en un cachorro con pioderma superficial en la zona ventral

**Figura 2.** Pioderma profunda del pastor alemán con presencia de tejido erosionado y costras focales

**Figura 3.** Lesión típica de una pioderma superficial con la presencia de collaretes epidérmicos y pápulas

**Figura 4.** Presencia de erupciones papulares en abdomen de un canino originado por *Staphylococcus* sp. Multiresistente

**Figura 5.** Pioderma Superficial con presencia de collaretes epidérmicos en canino

**Figura 6.** Otitis externa en canino con lesiones típicas de inflamación, eritema, cerumen y mucho prurito

**Figura 7.** Frotis de una colonia de *S. pseudintermedius* con tinción Gram

**Figura 8.** Colonias típicas de coloración blanquecina de *S. pseudintermedius* en agar sangre

**Figura 9.** Vías para la diseminación bacteriana de plásmidos y transposones, de manera junta o independiente

**Figura 10.** Gel de electroforesis de los productos del desarrollo de la PCR-Múltiple primera etapa

**Figura 11.** Gel de electroforesis de los productos del desarrollo de la PCR-Múltiple segunda etapa

**Figura 12.** Gel de electroforesis de los productos del desarrollo de la PCR-Múltiple tercera etapa final

**Figura 13.** Gel de electroforesis de los productos de la PCR-Múltiple.

## I. INTRODUCCIÓN

La otitis y pioderma son enfermedades multifactoriales que afectan al perro (*Canis lupus familiaris*) y, en suma, representan la gran mayoría de los problemas dermatológicos en la práctica clínica veterinaria diaria de animales de compañía (Cerasela, 2013; Gortel, 2013). La piel posee dos tipos de microbiota bacteriana, una constituida por microorganismos saprófitos y, otra de microorganismos transitorios que pueden invadir la piel previamente afectada, provocando una alteración, que facilita la proliferación de bacterias oportunistas y el inicio de la infección (Antúnez *et al.*, 2009; Junjappa *et al.*, 2013).

Las piodermas en perros son consideradas como infecciones piogénicas localizadas en la piel (Ralf, 2008; Junjappa *et al.*, 2013), y la otitis una dolencia que se encuentra asociada usualmente a agentes infecciosos como bacterias y levaduras, siendo un factor importante que predispone a la presentación de estos cuadros, la estructura anatómica del oído del perro, cuyo ambiente oscuro y de poca ventilación favorece a la proliferación de estos agentes patógenos. Entre otros factores predisponentes a estos cuadros de otitis, destacan la edad y la raza (Sánchez *et al.*, 2011).

A partir de muestras de piodermas y otitis, se pueden aislar una gran variedad de agentes bacterianos, entre ellos *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp., *Proteus* sp., *Pseudomonas* sp. y *Escherichia coli*. Por mucho tiempo se reconoció que dentro de las especies del género *Staphylococcus* más frecuentes en piodermas y otitis bacterianas en perros se encontraban *S. aureus*, *S. intermedius*, *S. epidermidis* y *S. schleiferi* (Senturk *et al.*, 2005; May *et al.*, 2006; Frank *et al.*, 2009; Sánchez *et al.*, 2011). Sin embargo, debido al análisis molecular secuencial del multilocus del grupo de los *Staphylococcus intermedius* (SIG), se determinó que el *S. pseudintermedius* es el agente etiológico de mayor importancia e impacto en la pioderma en perros y no el *S. intermedius*, como se solía creer hasta el año 2005 (Fitzgerald, 2009).

Las toxinas son consideradas factores de virulencia en la patogénesis de muchas bacterias. Las toxinas producidas por *Staphylococcus pseudintermedius* descritas hasta la fecha, se pueden clasificar en tres grupos principales: superantígenos de toxina pirogénica (PTSAgs), que comprende la toxina del síndrome de shock tóxico (TSST), seguido de las enterotoxinas estafilocócicas (SE); toxinas exfoliativas, y el tercer grupo conformado por las citotoxinas; tales como leucocidinas y hemolisinas (Corredor *et al.*, 2011).

Los superantígenos de toxina pirogénica son proteínas exocelulares que pueden estimular la proliferación policlonal de linfocitos T, que da como resultado la liberación masiva de interleucinas y la producción de niveles tóxicos de citoquinas (Deurenberg *et al.*, 2005; Fraser *et al.*, 2008). Así mismo, se han identificado dieciocho enterotoxinas estafilocócicas asociadas a enfermedades como la mastitis, la artritis, la dermatitis atópica, la enfermedad inflamatoria intestinal y, la enfermedad de Kawasaki (McCormick *et al.*, 2001; Thomas *et al.*, 2007). La toxina exfoliativa SIET de *S. pseudintermedius* y la toxina exfoliativa EXI posiblemente desempeñan un papel en la patogénesis de las lesiones cutáneas y la otitis crónica en perros. Dicha toxina exfoliativa es codificada por el gen *siet* y difiere de las toxinas exfoliativas de *S. aureus* en peso molecular y antigenicidad (Iyori *et al.*, 2011; Garbacz *et al.*, 2013).

*Staphylococcus intermedius* produce una leucotoxina bicomponente (*luk-I*) similar a la leucocidina Pantón-Valentine (PVL) de *S. aureus*, que también está codificada por dos genes, *lukS-I* y *lukF-I*, que induce a la lisis celular (Futagawa-Saito *et al.*, 2004; Maali *et al.*, 2018). Dicha actividad citolítica se ha informado en macrófagos y neutrófilos. La acción de estas toxinas de *S. pseudintermedius* causa necrosis de las células inmunes a través de la liberación



de la toxina *luk-I*, que es capaz de reconocer el receptor de quimiocinas tipo 2 (Pulgarín, 2005; Maali *et al.*, 2018).

El gen *tst* del *S. aureus* que codifica la TSST está presente en hasta el 70% de cepas de *S. aureus* que fueron aislados de pacientes con el síndrome del shock tóxico (TSS), sin embargo, no se tienen muchos estudios de caracterización genética en perros. La potencia de la TSST radica en su capacidad para inducir eficientemente la proliferación y activación de células T (10,000 veces más eficientemente que otros antígenos) (Deurenberg *et al.*, 2005).

Según estudios de Sareyyüpoğlu *et al.*, (2013) de un total de 41 aislamientos (35 *S. intermedius*, 4 *S. aureus*, una *S. capitis* subsp. *ureolytica* y una *S. chromogenes*) de perros con piodermas, se detectó mediante PCR la presencia de un 100% del gen *siet* en todos los aislamientos de *S. intermedius*. Por otro lado, Ruzauskas *et al.*, (2016) detectó un 91% del gen *siet* y un 25% de los genes *lukS* y *lukF* en aislados de *S. pseudintermedius* provenientes de piodermas en perros, y a su vez un 60% y 40% de los genes *siet* y *lukS/lukF* respectivamente en casos de otitis caninas.

Se ha evidenciado la transmisión de *Staphylococcus pseudintermedius* entre humanos y perros que han estado en contacto, debido a la estrecha relación que existe con el perro, que es un animal doméstico de compañía (Boost *et al.*, 2008; Hanselman *et al.*, 2009). Se han reportado casos de infecciones clínicas en humanos, tales como bacteriemia y absceso cerebral. Por otra parte, en un estudio realizado por Hanselman *et al.*, (2009), donde 242 humanos fueron evaluados para determinar la colonización de *Staphylococcus* sp. a causa de sus mascotas, se obtuvo como resultado un 4.1% (10/242) de prevalencia en la evaluación de la colonización nasal por *S. pseudintermedius*. Así mismo, otro estudio realizado por Kmiecik y Szewczyk (2018) determinó las características fenotípicas y genotípicas de *Staphylococcus pseudintermedius* provenientes de perros con piodermas para colonizar de manera efectiva la piel humana y desarrollar la infección, donde se obtuvo que un 80% de las cepas de *S.*

*pseudintermedius* de perros, mostraron un efecto inhibidor sobre la microbiota normal de la piel humana y la presencia de toxinas estafilocócicas.

En la actualidad no se han determinado las características patogénicas en *S. pseudintermedius* circulantes en piodermas y otitis en perros en nuestro país, conociendo que es el principal agente etiológico y puede presentar más de un factor de virulencia asociado a toxinas, incrementando su poder patógeno y el potencial riesgo para la salud de las mascotas y la transmisión a los humanos. Por ello, el propósito del presente estudio es determinar el perfil patogénico genético asociado a toxinas de *S. pseudintermedius* aislados de muestras clínicas de piodermas y otitis caninas durante los años 2016-2018 del cepario del Laboratorio de Microbiología y Parasitología Veterinaria, Sección Bacteriología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (FMV-UNMSM).

## **II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Generalidades**

#### **2.1.1 Pioderma canina**

La pioderma canina estafilocócica es una infección piogénica localizada en la superficie corporal del animal y es una patología de mucha frecuencia en la práctica clínica veterinaria (Ralf, 2008; Junjappa *et al.*, 2013). A nivel mundial la pioderma en perros es una de las enfermedades de piel más diagnosticadas, y se desconocen los motivos que originan esta elevada tasa de frecuencia en perros comparados con otros mamíferos (Russell, 2014; Giacoboni *et al.*, 2017). Determinadas características de la piel del perro podrían ser responsables de ciertos factores que potenciarían la infección. Dentro de estos factores tenemos la presencia de un estrato corneo delgado y a la vez compacto, un disminuido material lipídico intracelular, la no presencia de tapón epitelio-escamoso de contenido lipídico en la base de los folículos y el relativo elevado pH que posee la piel de esta especie,

consecuentemente, dando lugar a una barrera epidérmica de menor eficacia. El cuadro de infección ocurre debido a que las barreras, tanto cutáneas como mucosas, han sufrido una alteración, y esto, a partir de lesiones causadas por procedimientos de intervención quirúrgica o medicamentosa, por cuadros dermatológicos parasitarios o atópicos, factores ambientales o por enfermedades de origen metabólico (hipotiroidismo o el hiperadrenocortisismo) (Russell, 2014; Giacoboni *et al.*, 2017).

Las piodermas caninas se clasifican de 3 principales grupos, siguiendo estos criterios: A) por la profundidad de la afección pudiendo ser superficial y profunda; B) según el agente causal, es decir referido al microorganismo patógeno causante de la infección; C) según la causa, sea primaria o secundaria. La pioderma superficial está caracterizada por lesiones observables como pústulas, pápulas, collaretes epidérmicos, costras focales y prurito (Figura 1). Por otra parte, las piodermas profundas son menos frecuentes y a menudo de mayor dificultad de tratamiento (Figura 2). La clasificación según el grado de profundidad de la afección es de gran importancia clínica, ya que, a mayor grado de profundidad del área afectada, el tratamiento de la enfermedad base será más agresivo (Russell, 2014).

El agente etiológico que se encuentra involucrado en mayor proporción en esta patología, es el *Staphylococcus pseudintermedius*, el cual es una especie bacteriana que forma parte de la microbiota normal del perro; presente, en la boca en un 57% de la microbiota, en el periné un 52% y en las ingles un 23% (Giacoboni *et al.*, 2017). Además, se ha reportado la presencia en un 90% de animales sin signos clínicos aparentes de enfermedad, siendo un patógeno oportunista, que no origina enfermedad, a menos que el estado inmunológico del hospedador se encuentre dañado o la barrera cutánea se haya alterado por diversos factores (Giacoboni *et al.*, 2017).

*S. pseudintermedius* actúa como un agente patógeno cuando se rompe el equilibrio de la barrera cutánea debido a cambios en el microambiente, todo ello debido a enfermedades base, las que ocasionan prurito, lamido y auto traumatismo, lo cual favorece la colonización de este

agente, iniciando el proceso de infección, y cuya colonización está muy ligada a los factores de virulencia que estas cepas posean, por ello, es que la gran mayoría de las piodermas son clasificadas como secundarias (Russell, 2014; Monzant *et al.*, 2019).

La historia clínica y el examen físico realizado al paciente que posee lesiones y signos clínicos típicos, nos guiarán al diagnóstico de esta patología (Figura 3, 4, 5) (Russell, 2014). Sin embargo, se deben considerar diagnósticos diferenciales con diversas patologías dermatológicas como el pénfigo foliáceo, celulitis juvenil, entre otras. Por lo cual, es de mucha importancia confirmar el diagnóstico utilizando pruebas de laboratorio básicas como un raspado de piel, un cultivo bacteriano, un antibiograma para medir la sensibilidad antibiótica, exámenes citológicos y estudios de histopatología (Russell, 2014).



Figura 1. Erupción papular, pústulas interfoliculares y costras en un cachorro con pioderma superficial en la zona ventral (Balazs, 2012).



Figura 2. Pioderma profunda del pastor alemán con presencia de tejido erosionado y costras focales (Balazs, 2012).



Figura 3. Lesión típica de una pioderma superficial con la presencia de collaretes epidérmicos, pápulas y prurito (Balazs, 2012).



Figura 4. Presencia de erupciones papulares en abdomen de un canino originado por *Staphylococcus* sp. multiresistente (Hnilica y Patterson, 2007).



Figura 5. Pioderma Superficial. Collares epidérmicos en canino (Hnilica y Patterson, 2007).

### 2.1.2 Otitis externa canina

La otitis de localización externa es la principal causa de morbilidad del canal auditivo en el perro, y se caracteriza por un cuadro inflamatorio de tipo crónico o agudo del epitelio que se encuentra en el meato auditivo externo (Manzuc, 2011). La otitis externa involucra al pabellón auricular, canal vertical y/o horizontal (Manzuc, 2011; Arévalo y Arpi, 2015).

La signología de esta patología cursa con inflamación, aumento significativo de descarga auricular, prurito y dolor (Figura 6) (Soler *et al.*, 2000; Arévalo y Arpi, 2015). La alteración del microclima del conducto auditivo externo es un factor predisponente, y esto ocurre, cuando existen variaciones climáticas (temperatura y humedad), anatómicas (la estructura del pabellón auricular) o por ciertas enfermedades sistémicas (disturbios en la piel y endócrinos) (Soler *et al.*, 2000; Arévalo y Arpi, 2015). Todas estas alteraciones, si bien no inducen directamente la otitis, facilitan la colonización del conducto auditivo externo por agentes patógenos u oportunistas (Soler *et al.*, 2000; Arévalo y Arpi, 2015).

Estos factores predisponentes generan los cuadros inflamatorios auriculares y son los culpables para que se desarrolle el curso de la enfermedad (Manzuc, 2011; Arévalo y Arpi, 2015). Generalmente en esta patología se observan afecciones microbianas mixtas, infecciones bacterianas (principalmente cocos), hongos y levaduras (Arévalo y Arpi, 2015). Las bacterias que se aíslan con mayor frecuencia en estos cuadros de otitis externas en el perro, son los estafilococos coagulasa positivos (*S. aureus*, *S. intermedius*, *S. pseudintermedius*, *S. schleiferi subsp coagulans*) (Manzuc, 2011; Arévalo y Arpi, 2015).

El progreso de esta enfermedad con el tiempo puede originar cambios irreversibles sobre la epidermis, dermis y folículos pilosos de la piel que conforman el conducto externo del oído. Consecuentemente, originando la inhibición de la migración epitelial normal, mayor acumulación de secreciones y proliferación de microorganismos (Manzuc, 2011). Sumado a



estos factores, se adicionan aquellos que son perpetuantes, que aparecen después del estado inflamatorio auricular y ocasionan la cronicidad de la enfermedad (Arévalo y Arpi, 2015).



Figura 6. Otitis externa en canino con unas lesiones típicas de inflamación, eritema, cerumen y mucho prurito (Manzuc, 2011).

### 2.1.3 Género *Staphylococcus*

El género *Staphylococcus* (del griego *staphyle*, que significa racimos de uvas) agrupa a una gran variedad de microorganismos comensales de la piel y membranas mucosas, que pueden actuar como patógenos oportunistas en diferentes enfermedades estudiadas en medicina veterinaria (Quinn *et al.*, 1994; Cervantes *et al.*, 2014; Vigo *et al.*, 2015).

Este género está constituido por cocos Gram positivos de aproximadamente 0.5 a 1.5  $\mu\text{m}$  de diámetro, que pueden presentarse sueltos como células únicas, en parejas, tétradas, en pequeñas cadenas o la forma característica de racimos de uvas (Figura 7) (Cervantes *et al.*, 2014). Generalmente anaerobios facultativos y catalasa positivos, la mayoría oxidasa negativos, no esporulados, no poseen cápsula y no móviles. La gran mayoría de estafilococos producen la enzima catalasa capaz de desdoblar el peróxido de hidrogeno en agua y oxígeno libre; la cual es una característica que se utiliza para diferenciarla del género *Streptococcus* y *Enterococcus* que son catalasa negativos. Las colonias típicas tienen una coloración blanquecina en agar tripticasa de soja y de bordes regulares (Figura 8) (Antúnez *et al.*, 2009; Markey *et al.*, 2013; Cervantes *et al.*, 2014).

El género *Staphylococcus* alberga 32 especies, de las cuales en los humanos se localizan 16 especies, algunas conformando la microbiota de piel y mucosas, y otras en la microbiota de mamíferos y/o aves. Dentro de estas especies existen las patógenas, que se presentan cuando existe predisposición o inmunosupresión en el huésped (Cervantes *et al.*, 2014).

Durante bastante tiempo se reconoció que dentro de las especies del género *Staphylococcus* más frecuentes en piodermas y otitis bacterianas en perros se encontraban *S. aureus*, *S. intermedius*, *S. epidermidis* y *S. schleiferi* (May *et al.*, 2006; Frank *et al.*, 2009; Sánchez *et al.*, 2011). Sin embargo, en el año 2005, el *Staphylococcus intermedius*, una especie coagulasa positivo, reconocido como el agente causal de la mayoría de las piodermas caninas, fue

reclasificado en tres especies similares fenotípicamente: *S. intermedius*, *S. pseudintermedius* y *S. delphini* (Bannoehr *et al.*, 2007). Además, mediante el análisis molecular de la secuencia del multilocus del grupo de los *Staphylococcus intermedius* (SIG), se descubrió que el *S. pseudintermedius* era el agente etiológico más importante de la pioderma canina y no el *S. intermedius*, como se solía creer (Fitzgerald, 2009). Por lo cual, se llevó a una nueva clasificación un gran número de aislamientos que habían sido determinados como *Staphylococcus intermedius* en varios continentes a *S. pseudintermedius* (DePaulis, 2017).

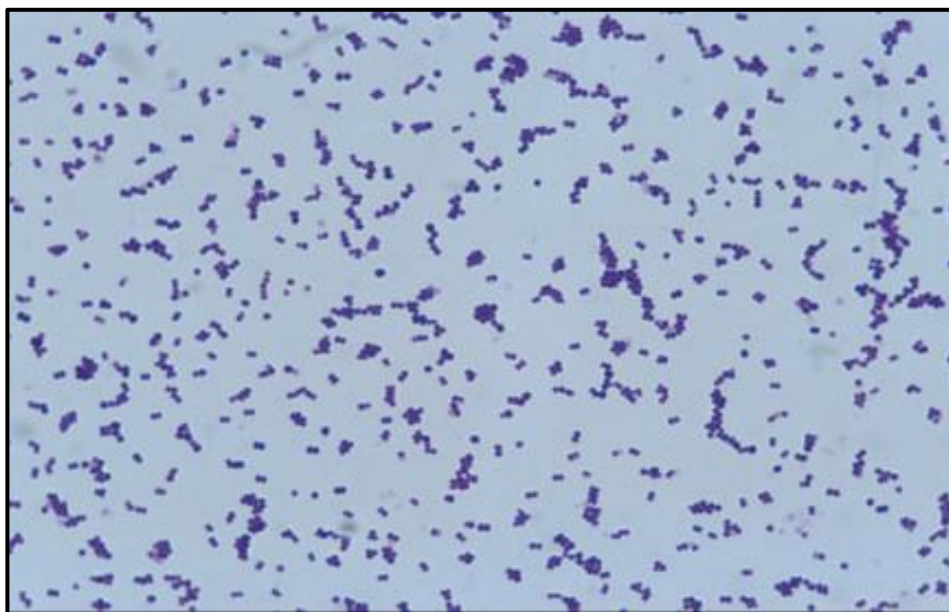


Figura 7. Frotis de una colonia de *S. pseudintermedius* con tinción Gram (Markey *et al.*, 2013).

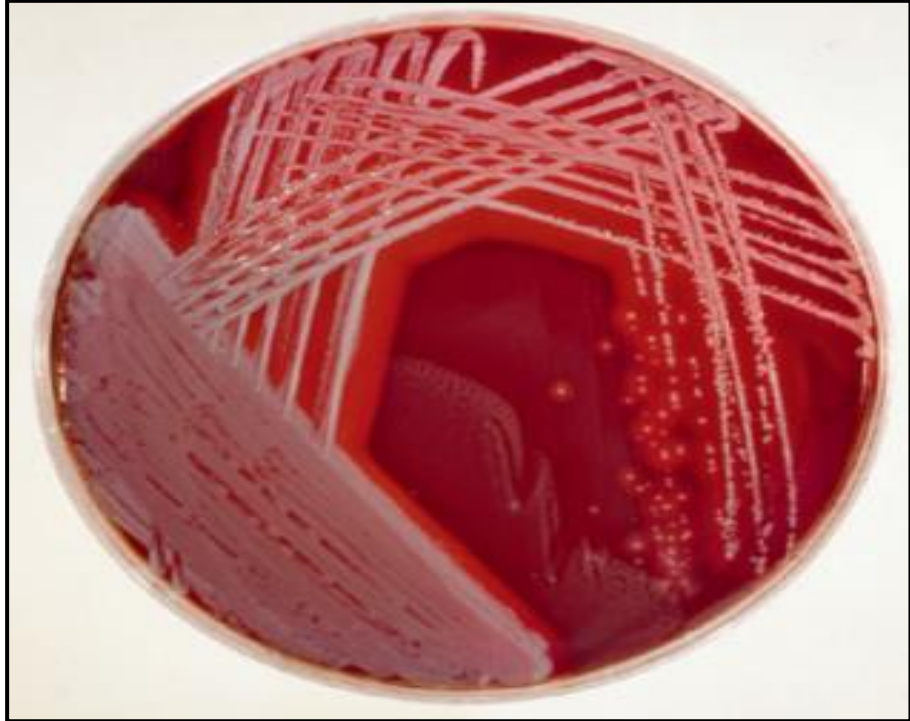


Figura 8. Colonias típicas de coloración blanquecina de *S. pseudintermedius* en agar sangre de oveja (Markey *et al.*, 2013).

### 2.1.3.1 *Staphylococcus pseudintermedius*

La mayoría de las colonias de *S. pseudintermedius* producen hemólisis, positivas a las pruebas de catalasa y coagulasa; observándose la coagulación dentro de cuatro horas pos incubación a 35°C generalmente (Markey et al., 2013). Existen pruebas bioquímicas como la fermentación de la trehalosa, la ausencia de fermentación de la xilosa y la prueba de la beta-galactosidasa, que se pueden usar para diferenciar esta especie de otros estafilococos (Markey et al., 2013). Sin embargo, los métodos moleculares son los más confiables para la identificación definitiva (Markey et al., 2013).

Diversos estudios han determinado que *Staphylococcus pseudintermedius* es la causa más común presente en infecciones cutáneas caninas, con un 76% de prevalencia en Japón y un 92% promedio de prevalencia en China (Onuma et al., 2011; Wang et al., 2012).

*S. pseudintermedius* no es parte de la microbiota normal en los humanos, sin embargo, se ha demostrado el potencial que tiene este agente para poder colonizar el organismo humano y se han detectado casos de infecciones humanas a raíz de *S. pseudintermedius* de perros con piodermas, evidenciando la capacidad de colonización de este agente en la piel humana y la presencia de ciertos genes asociados a toxinas que favorecen el desarrollo de infecciones cutáneas en el ser humano. Así mismo, existen cepas resistentes a la meticilina, es decir, resistentes a muchos antibióticos, incrementando el poder patógeno de esta bacteria y dificultando la resolución de este cuadro infeccioso. Se ha determinado que existe una transmisión antroponozoonótica, una zoonosis de impacto a nivel mundial (Kmieciak y Szewczyk, 2018; Tulcán, 2018).

### 2.1.3.2 Factores de virulencia

Se denominan factores de virulencia a las moléculas producidas por las bacterias que tienen la capacidad de inducir a la enfermedad (González, 2015). La patogenia de una infección bacteriana depende esencialmente de los factores de virulencia que su genoma contenga y de la capacidad que tenga para expresarlos, desde cuando actúa como agente colonizador o como agente infeccioso (Benito, 2016). La expresión de genes de virulencia asociados a ciertas toxinas está controlada por una compleja red de regulación transcripcional (Camussone y Calvino, 2013).

Existen características patogénicas presentes en los *Staphylococcus* que originan que las medidas preventivas y curativas tradicionales no sean efectivas, produciendo en muchos cuadros clínicos la cronicidad de las infecciones. La búsqueda de otras alternativas distintas a los antibióticos para ser coadyuvantes en el tratamiento de la enfermedad, ha llevado a buscar opciones, como la manipulación de mecanismos de defensa específicos que posee el hospedador mediante el uso de inmunógenos, que inducen una respuesta inmunitaria específica humoral, celular o mixta (Camussone y Calvino, 2013). Por ello es fundamental identificar los factores de virulencia que estimulan el sistema de defensa humoral y celular específicos, para tener mecanismos que permitan controlar la enfermedad (Camussone y Calvino, 2013).

Mediante cultivo *in vitro*, se determinó que los factores de virulencia asociados a la superficie bacteriana generalmente se expresan en la fase logarítmica de crecimiento, por otra parte, los factores de virulencia de secreción son liberados en la fase pos logarítmica. Esta expresión bifásica delimitaría el proceso de organización de la infección (Camussone y Calvino, 2013).

Existen muchos factores de virulencia, como proteasas, factores inmunomoduladores, toxinas como hemolisinas, leucocidinas, enterotoxinas, toxinas exfoliativas y adhesinas (Cuadro 1) (Markey *et al.*, 2013). Dichas toxinas pueden afectar directamente los tejidos o generar

actividades biológicas destructivas (González, 2015). Siendo los componentes de la pared celular los responsables de estas lesiones, que al producir enzimas degradativas ocasionan lisis de la célula y, además, pueden unirse a ciertos tipos de receptores específicos (González, 2015). Consecuentemente, iniciando reacciones tóxicas en un tejido diana específico o en otros casos la respuesta sistémica debido a la liberación acentuada de citocinas. De este modo, dichas toxinas son las responsables de la sintomatología clásica de diversas enfermedades (González, 2015).

*Staphylococcus aureus* expresa una gama de potenciales factores de virulencia, entre los cuales tenemos; a) proteínas de superficie que inducen la colonización de los tejidos; b) invasinas que inducen la proliferación bacteriana en el tejido; c) factores relacionados a la superficie como la micro cápsula que inhibe la fagocitosis; d) ciertas características bioquímicas que incrementan la supervivencia a la fagocitosis; e) factores coagulantes que actúan como disfraces del sistema inmune; f) toxinas que lisan las membranas (hemolisinas y leucocidinas); g) exotoxinas; h) factores relacionados a la resistencia propia o adquirida a ciertos antibióticos (Gómez, 2006).

Cuadro 1. Principales factores de virulencia de *Staphylococcus pseudintermedius* en medicina veterinaria y su mecanismo de acción (Markey *et al.*, 2013).

<b>Especie</b>	<b>Factor de virulencia</b>	<b>Mecanismo de acción</b>
<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	Proteínas de superficie	Adherencia a la fibronectina, colágeno, lactoferrina
	Factor de agrupamiento	Adherencia al fibrinógeno
	Coagulasa (proteína extracelular)	Adherencia a la protrombina, transforma el fibrinógeno en fibrina
	Glycocalix (ex polisacárido)	Inhibición de la fagocitosis
	Proteína A	Adherencia al fragmento Fc de la inmunoglobulina G, inhibe la fagocitosis
	Toxina exfoliativa	Dermatitis pustular
	Leucocidinas	Lisis de leucocitos
	Hemolisina beta (beta toxina)	Esfingomilinasas C, lisis de eritrocitos
	Enterotoxinas	Actividad de superantígeno en linfocitos T: vómitos, diarrea, shock.

### 2.1.3.3. Toxinas asociadas a *Staphylococcus pseudintermedius*

#### A) Citotoxina: *Leucotoxina bicomponente*

*Staphylococcus pseudintermedius* produce una leucotoxina bicomponente (*luk-I*) similar a la leucocidina Pantón-Valentine (PVL) de *S. aureus* (Futagawa-Saito *et al.*, 2004; Maali *et al.*, 2018). La PVL fue descubierta por Pantón y Valentine en el año 1932, es una toxina sinergohimenotrófica, es decir conformada por dos subunidades proteicas codificadas en dos genes (*lukS-PV* y *lukF-PV*); dichas proteínas funcionan de manera sinérgica después de su expresión independiente y posterior co-ensamblaje (Pulgarín, 2005; Bannoehr, 2012; Benito, 2016).

Estudios han demostrado que solo está presente en un 2-4% de cepas de *S. aureus*, sin embargo, es la toxina de mayor importancia producida por este microorganismo debido a que su potencial patogénico radica en la destrucción leucocitaria, hemólisis y necrosis tisular. La acción de esta toxina está relacionado a afecciones cutáneas y subcutáneas de tipo severas en el hombre, neumonías necrotizantes letales y en menor frecuencia a septicemias (Pulgarín, 2005; Benito, 2016).

La leucotoxina bicomponente está compuesta por dos cadenas de polipéptidos S y F que actúan en sinergismo para destruir las membranas celulares mediante la formación de poros, y generalmente su acción se localiza en las membranas de los macrófagos y neutrófilos (Pulgarín, 2005).

Se ha determinado que la presencia de la toxina *luk-I* origina la leucotoxicidad de las células polimorfonucleares y en menor grado hemólisis de eritrocitos en conejos. La distribución de *luk-I* en la población de cepas de *S. pseudintermedius* que están involucradas en las diferentes



infecciones de piel en caninos se vienen reportando, pero aún se conoce muy poco sobre el papel fisiopatológico en el perro (Bannoehr, 2012).

La liberación de la toxina *luk-I* de *S. pseudintermedius* causa necrosis de las células inmunes, ya que es capaz de reconocer el receptor de quimiocinas tipo 2 en polimorfonucleares y macrófagos. Además, *S. pseudintermedius* puede secretar otros factores de virulencia que destruyen la membrana celular, como las modulinas solubles en fenol, que tienen fuerte efecto citotóxico en las células inmunes como en las células fagocíticas no especializadas (Maali *et al.*, 2018).

### ***B) Toxinas exfoliativas***

Las exfoliatinas son proteasas (enzimas que se encargan de romper los enlaces peptídicos) que se originan en el espacio extracelular de la desmogleína 1, que ocasionan una falla en la estabilidad de las células epiteliales por la alteración de los desmosomas responsables de la unión celular epitelial (Iyori *et al.*, 2011; Garbacz *et al.*, 2013). Dichas toxinas son responsables del síndrome de la piel escaldada estafilocócica, patología caracterizada por la deshidratación y la pérdida de los estratos epidérmicos con desprendimiento de grandes colgajos, que conlleva a infecciones por parte de otros microorganismos oportunistas (Chans, 2002; Benito, 2016).

La toxina exfoliativa SIET de *S. pseudintermedius*, codificada por el gen *siet* y la toxina exfoliativa EXI posiblemente desempeñan un papel en la patogénesis de las lesiones cutáneas caninas y la otitis crónica canina, ya que estas toxinas escinden los desmosomas de la capa granulosa a nivel de la epidermis (Chans, 2002; Iyori *et al.*, 2011; Garbacz *et al.*, 2013).

Estudios para evaluar la capacidad de la toxina SIET de *S. pseudintermedius* en modelos animales mediante aplicaciones de inyecciones subcutáneas en pollos, hámsteres y perros de un día de nacido, evidenciaron un efecto exfoliativo (Bannoehr, 2012). Los perros que fueron

inyectados con la toxina SIET desarrollaron un cuadro clínico manifestado con eritema, exfoliación y formación de costras, tan similar a los signos clínicos presentes en la pioderma canina o el síndrome de la piel escaldada por *Staphylococcus* en humanos (Bannoehr, 2012). Investigaciones de prevalencia del gen *siet* mediante PCR en 45 aislamientos de *S. pseudintermedius* de caninos con piodermas y otitis externas detectaron casi un 100% de presencia de este gen responsable de la codificación de esta toxina (Bannoehr, 2012).

### ***C) Superantígenos de Toxinas Pirogénicas (PTSAg)***

Este grupo está conformado por toxinas exocelulares, dentro del cual tenemos a la Toxina del Síndrome del Shock Tóxico (TSST), y a 18 enterotoxinas estafilocócicas. La característica típica de este grupo de toxinas es la capacidad que tienen para estimular la producción de grandes números de células T en el hospedador, ocasionando un aumento significativo en el nivel de expresión de citoquinas celulares que son altamente tóxicas (Benito, 2016).

La TSST (codificada por el gen *tst*) es el agente causal del Síndrome del Shock Tóxico (SST), que presenta un cuadro clínico de dolor de cabeza, fiebre elevada, hipertensión, aumento de la sensibilidad al shock endotóxico, desorientación, vómitos, diarrea y erupciones cutáneas (Martínez, 2005; Benito, 2016).

Los superantígenos no son detectados directamente por las células presentadores de antígenos, sino que, por lo contrario, se unen a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II, generando la sobre estimulación masiva (proliferación policlonal) de los linfocitos T y la descarga de citoquinas. Este tipo de evasión del sistema inmune contribuye a la persistencia de la infección bacteriana (Martínez, 2005).

Los desencadenantes ambientales y los mecanismos moleculares que controlan la producción de la TSST son complejos, y no se comprenden completamente. Hasta la actualidad se han evaluado múltiples factores, como la glucosa, el pH, el CO<sub>2</sub>, el O<sub>2</sub>, el NaCl, la concentración

de magnesio, las cadenas de hemoglobina, y se ha demostrado que estos parámetros afectan la producción de dicha toxina, lo cual nos hace inferir que la expresión del gen *tst* está estrictamente regulada. Así mismo, se ha reportado la presencia del gen *tst* en un estudio realizado en Brasil obteniendo un 44% y 10% en aislados de *Staphylococcus pseudintermedius* de piodermas y otitis positivas para este gen (Andrey *et al.*, 2010; Pitchenin *et al.*, 2017).

Se ha demostrado que *S. pseudintermedius* produce ciertas proteínas que reaccionan en forma cruzada con los anticuerpos producidos contra los superantígenos estafilocócicos y la TSST-1. Sin embargo, la actividad superantígena de estas proteínas en *S. pseudintermedius* no se encuentra del todo estudiada (Bannoehr, 2012). Hasta la actualidad se han descrito 18 enterotoxinas estafilocócicas (SE). Este grupo está relacionado con la mayoría de las toxoinfecciones alimentarias por *S. aureus*, ya que dichas toxinas son altamente termoestables y resistentes a las enzimas de defensa presentes en nuestro tracto gastrointestinal (Benito, 2016). Sumado a esto, se han reportado como agentes causales de enfermedades como artritis, dermatitis atópica y enfermedad de Kawasaki (Benito, 2016). Estudios en medicina veterinaria no han descrito que este grupo de toxinas hayan causado las enfermedades mencionadas anteriormente en perros, sin embargo, si se ha comprobado que estas toxinas favorecen la inmunosupresión del animal (Martínez, 2005).

#### **2.1.3.4 Regulación de los factores que determinan la virulencia**

La expresión de los factores de virulencia de los estafilococos está regulada por diferentes sistemas que son sensibles a señales ambientales (Martínez, 2005). Dichos sistemas están conformados por dos componentes de proteínas, un sensor de membrana (histidín quinasa) y un regulador de respuesta citoplasmática (Martínez, 2005). Estos sensores fijados a ligandos extracelulares específicos producen una cascada de fosforilación que origina la fijación del regulador de respuesta a secuencias específicas del ADN, lo que activa las funciones de regulación de la transcripción (estimula o reprime) de sus genes diana, que generan una respuesta adecuada a la señal captada (Martínez, 2005; Brooks *et al.*, 2010).

*S. aureus* contiene diferentes sistemas de regulación de dos componentes bien identificados, de los cuales, los más estudiados han sido el Sistema regulador del gen accesorio (*Agr*) y la de proteínas homólogas a *sarA* que promueven la síntesis de proteínas que se unen al fibrinógeno y fibronectina (Martínez, 2005; Brooks *et al.*, 2010).

El regulador del gen accesorio denominado *Agr* es indispensable en el control de la percepción del quórum de la expresión genética. Además, controla la expresión de adhesinas de superficie (proteína A, coagulasa y proteína fijadora de fibronectina), inhibiéndolas y activando la expresión de toxinas como la producción de la TSST-1, factores de virulencia asociados a la adquisición de nutrientes, de supervivencia y de diseminación bacteriana. El mecanismo por el cual se regula la transcripción de estos genes es desconocido (Pulgarín, 2005; Brooks *et al.*, 2010). Además, existen otros sistemas reguladores de dos componentes que actúan como mediadores entre las señales medioambientales (glucosa, pH, niveles de oxígeno, concentración de sal) (Martínez, 2005).

### 2.1.3.5 Islas de Patogenicidad

En la genética de la virulencia, las islas de patogenicidad (PAI) son elementos genéticos o fracciones de ADN de aproximadamente 14-17 kilobases de tamaño, móviles y, según estudios, facilitadoras en gran medida de la evolución, modificación y diseminación de muchos factores de virulencia entre poblaciones bacterianas de diversas especies (Forbes *et al.*, 2009; Benito, 2016). Estas PAI requieren de un fago que actúe de vehículo para la integración posterior que debe realizar en uno de los distintos puntos cromosómicos de inserción específica (Benito, 2016).

La evolución de estos elementos genéticos se considera que fue a partir de bacteriófagos y plásmidos lisogénicos, y que se diseminan por transferencia horizontal génica (Forbes *et al.*, 2009).

Las islas de patogenicidad están conformadas por uno o diversos genes asociados a la virulencia y además genes relacionados con la movilidad (transposasas e integrasas), que permiten el movimiento de múltiples elementos genéticos como plásmidos y cromosomas (Figura 9) entre distintas cepas bacterianas, facilitando la capacidad de diseminación de la virulencia y genes de resistencia a muchos antimicrobianos (Forbes *et al.*, 2009).

Poder conocer la existencia y la función de estas islas de patogenicidad es muy importante para analizar los factores de virulencia que están relacionados a ciertos agentes bacterianos y poder conocer cuan diseminado se haya este mecanismo genético entre bacterias que demuestran importancia clínica, tanto en la salud de los animales como la humana (Forbes *et al.*, 2009).

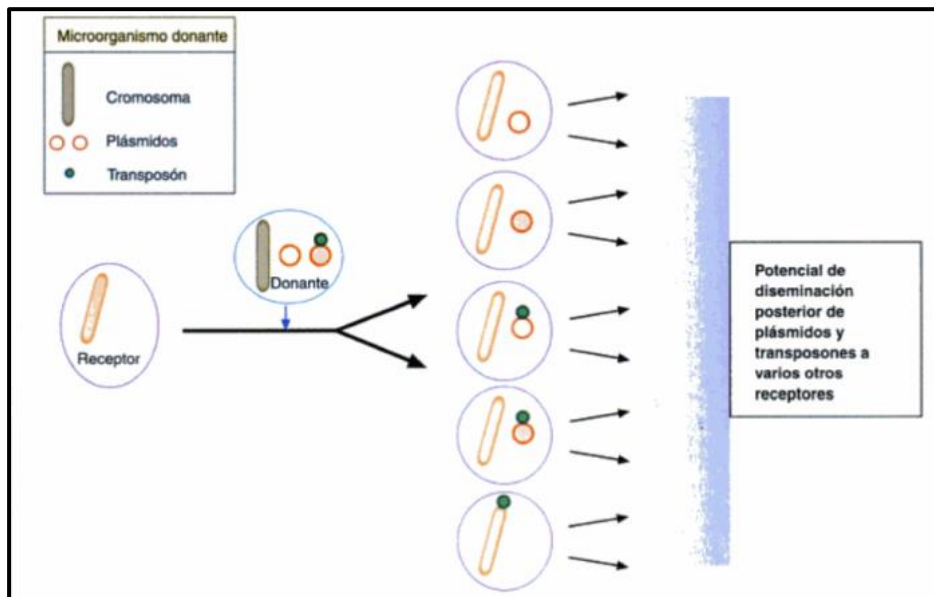


Figura 9. Vías para la diseminación bacteriana de plásmidos y transposones, de manera conjunta o independiente (Forbes *et al.*, 2009)

Se han establecido estudio de islas de patogenicidad en ciertos agentes bacterianos, como relacionados a la presencia del gen *tst* en *Staphylococcus aureus*, el cual permitió identificar una isla de patogenicidad denominada SaPI1, que consta de 15,233 kb y es una PAI altamente móvil e inestable (Rocha *et al.*, 2004). Sumado a este estudio, se identificó un segundo locus que es portador del gen *tst* y se denominó SaP2. Identificar estas PAI nos permite conocer el origen de ciertos genes cromosómicos que codifican para ciertas toxinas que están asociadas a la virulencia que el agente bacteriano posee (Rocha *et al.*, 2004). Sin embargo, no existen estudios hasta la actualidad relacionados a estas PAI en *Staphylococcus pseudintermedius*.

## **2.2. Identificación Molecular de *Staphylococcus pseudintermedius***

### **2.2.1 Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)**

La reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction) es una técnica de biología molecular, cuya finalidad es poder amplificar un fragmento de ADN particular, determinado por dos cebadores (f: *forward* y r: *reverse*) (Benito, 2016). Esta técnica fue desarrollada en el año 1986 por el Dr. Kary Mullis en Estados Unidos, con la cual obtuvo el premio nobel en 1993 (Salazar *et al.*, 2013). La base de esta técnica se centró en la necesidad de obtener un mayor número de copias de ciertas secuencias específicas de ADN *in vitro* utilizando ciclos repetitivos a tres temperaturas diferentes establecidas (Mülhardt, 2007; Salazar *et al.*, 2013).

### **2.2.2 PCR-RFLP**

La diferenciación con pruebas bioquímicas para identificar al *S. pseudintermedius* de otras especies de *Staphylococcus* propuesta por Sasaki *et al.*, (2007) no logró obtener marcadores que permitieran discriminar al *S. pseudintermedius*, la especie de mayor prevalencia en las infecciones cutáneas en caninos. Sin embargo, un método de reacción en cadena de polimerasa con un análisis del polimorfismo de longitud en los fragmentos de restricción (PCR-RFLP) amplificando el gen *pta* propuesto por Bannoehr *et al.*, (2009), logró diferenciar al *S. pseudintermedius* de otras especies.

La detección del gen *pta*, que codifica la enzima fosfoacetiltransferasa, reveló un sitio de restricción MboI que solo presentan las cepas de *S. pseudintermedius*, y la ausencia en todas las demás cepas de *S. intermedius* y *S. delphini*. Además, *S. aureus* si poseía este mismo sitio de restricción para este gen, pero en un lugar diferente al de *S. pseudintermedius* permitiendo la diferenciación (Bannoehr *et al.*, 2009; Alvarez, 2019).

### **2.3. PCR-Múltiple**

Fue descrita por primera vez en 1988 por Chamberlain y colaboradores con la finalidad de poder amplificar *locis* múltiples para el gen de la distrofia muscular en humanos, desde entonces esta técnica permite el análisis simultáneo de marcadores múltiples incluyendo delecciones, mutaciones, polimorfismo y análisis cuantitativos por transcriptasa reversa obteniendo óptimos resultados (Bolivar *et al.*, 2014).

La importancia de esta técnica radica en la factibilidad de que en una sola reacción se pueda realizar la detección simultánea de varios microorganismos teniendo en cuenta ciertos parámetros de similitud de los cuadros clínicos o la identificación simultanea de distintos genes de interés (Méndez y Pérez, 2004; Bolivar *et al.*, 2014).

La eficiencia de esta técnica requiere de estrategias de planificación y múltiples intentos para lograr la optimización del procedimiento, considerando las características adecuadas que influyen en una PCR convencional (dNTPs, iones divalentes y monovalentes, buffer, cebadores, oligonucleótidos, ADN molde, agua), y que deben adaptarse por el investigador. Una óptima combinación entre los componentes de la reacción y la temperatura de alineamiento o hibridación permitirán obtener una alta especificidad en la amplificación de los productos (Bolivar *et al.*, 2014).



Optimizar una PCR-Múltiple necesita un balance delicado para la amplificación de los productos específicos y una reducción al mínimo de productos inespecíficos para poder obtener productos de calidad (Bolívar *et al.*, 2014). En este sentido, se ha demostrado que la utilización de un mayor número de pares de cebadores por reacción, aumenta la aparición de productos inespecíficos, porque ocurre un secuestro de componentes esenciales en la reacción, disminuyendo la eficiencia (Bolívar *et al.*, 2014).

La adaptabilidad del protocolo de la PCR-Múltiple debe ajustar cada parámetro experimentalmente, para ello, se debe considerar cada paso del proceso de una manera muy cuidadosa (Bolívar *et al.*, 2014). Muchos estudios en los últimos años describen protocolos de PCR-Múltiple tendientes a mejorar procesos como la extracción de ADN desde una gran variedad de material biológico y poder realizar amplificaciones más sensibles y específicas, (mejor nivel de detección) lo que es deseable de alcanzar (Bolívar *et al.*, 2014). Por lo tanto, es una técnica muy útil y atractiva debido al ahorro de tiempo y esfuerzo que genera, sin poner en compromiso la efectividad de la prueba (Méndez y Pérez, 2004; Bolívar *et al.*, 2014).

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. Lugar de ejecución y periodo de duración**

El presente estudio se desarrolló en el Laboratorio de Microbiología y Parasitología Veterinaria, Sección Bacteriología y Micología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos durante los meses de setiembre del 2019 a marzo del 2020.

#### **3.2. Descripción del material experimental**

Se utilizaron 141 aislados de *Staphylococcus pseudintermedius* identificados genéticamente por PCR obtenidos de piodermas y otitis de perros criopreservados del cepario (colección de bacterias) del Laboratorio de Microbiología Veterinaria - Sección Bacteriología de la FMV-UNMSM, de muestras clínicas remitidas por Médicos Veterinarios de Lima durante el periodo 2016-2018. Dichas muestras fueron obtenidas mediante hisopados de lesiones compatibles con piodermas (pústulas, pápulas o collaretes epidérmicos), como de otitis externas.

### 3.3. Materiales y Equipos

#### 3.3.1. Material Biológico

- ✓ Cepas de *Staphylococcus pseudintermedius*
- ✓ Cepa de *Escherichia coli* ATCC 8739
- ✓ Cepa de *Bacillus subtilis* ATCC 6633
- ✓ Cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 43300

#### 3.3.2. Materiales y Equipos de Laboratorio

- ✓ Flujo Laminar (DNA/RNA UV Cleaner Box – *BIOSAN*)
- ✓ Termociclador Biometra TOne by *Analytik Jena*
- ✓ Equipo de electroforesis (*Cleaver Scientific*)
- ✓ Microcentrífuga ( *Thermo Scientific* )
- ✓ Vortex ( *IsoLab* )
- ✓ Estufa PRECISION *Thelco* (Rango de T° hasta 60°)
- ✓ Bloque de calor (*Thermo Scientific* )
- ✓ Transiluminador SafeVIEW (*Cleaver Scientific*)
- ✓ Congeladora (-20°) *Bosch®*
- ✓ Espectrofotómetro *DeNovix* DS-11FX
- ✓ Mechero
- ✓ Ansas
- ✓ Baño maría
- ✓ Placas Petri de vidrio 100x15 mm
- ✓ Micropipetas de 1000, 100 y 10 µl. *Eppendorf*
- ✓ Viales estériles de 1.5ml, 0.5 ml y 0.2 ml *Eppendorf*
- ✓ Punteras de micropipeta estériles de 1000, 100 y 10 µl. *Eppendorf*
- ✓ Gradillas
- ✓ Racks de laboratorio
- ✓ PCR Cooler *Eppendorf®*

- ✓ Guantes de nitrilo
- ✓ Mascarillas
- ✓ Tocas
- ✓ Papel Parafilm

### 3.3.3. Reactivos

- ✓ Kit de extracción de ADN (GeneJET™ Genomic DNA Purification Kit)
- ✓ 2X PCR HotStart MasterMix *Aplied Biological Materials ABM®*
- ✓ Cebadores *Macrogen Inc* (Cuadro 2)
- ✓ Agua grado molecular- libre de nucleasas IDT (*INTEGRATED DNA TECHNOLOGIES*)
- ✓ Lisozima (50mg/ml) *Merck*
- ✓ Etanol absoluto EMSURE®
- ✓ Agarosa *SIGMA Aldrich*
- ✓ Buffer TBE 10 (*Cleaver Scientific*)
- ✓ Marcador de peso molecular 100pb Opti-DNA Marker cat#G016 *Aplied Biological Materials ABM®*
- ✓ Buffer de carga Safe-Green *Aplied Biological Materials ABM®*
- ✓ EDTA 50mM
- ✓ Glicerol 50%
- ✓ Caldo Tripticasa de Soya (TSB)
- ✓ Agar Tripticasa de Soya

### 3.3.4. Programas informáticos

- ✓ Chromas, BioEdit, MegaAlign, EditSequence, BLAST

## 3.4. Metodología

### 3.4.1. Reactivación de los aislados

Los aislados de *Staphylococcus pseudintermedius* que se utilizaron en el estudio fueron criopreservados en micro viales de 1.5 ml utilizando un caldo de cultivo Tripticasa de

Soya (TSB) 0.5ml y glicerol al 50%(0.5ml), en una proporción de 50/50, a -20°C. Por lo cual, la primera parte del estudio consistió en la reactivación de los aislados, el cual se realizó mediante la inoculación de 100 µl del vial a un caldo de cultivo Tripticasa de Soya (TSB) e incubó a 37°C por 3 horas, posteriormente, se sembró en agar nutritivo Tripticasa de Soya (TSA) e incubó a 37°C por 24 horas esperando el crecimiento de las colonias.

#### **3.4.2. Extracción del ADN**

La extracción del ADN genómico se llevó a cabo con un kit de extracción de ADN (GeneJET™ Genomic DNA Purification Kit) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

En primer lugar, se tomó una colonia aislada de *Staphylococcus pseudintermedius* en agar TSA, y se la colocó en caldo TSB, y se incubó durante 18 horas. Posteriormente, se tomó 1mL de este caldo, se centrifugó a 10 000 RPM y se descartó el sobrenadante. El precipitado fue resuspendido en el buffer de lisis preparado según las instrucciones del kit de extracción, y consiguientemente se siguió la metodología descrita por el fabricante (ANEXO 1).

#### **3.4.3. Reacción en cadena de la polimerasa múltiple (PCR-Múltiple)**

Para el desarrollo de la PCR-Múltiple se tomó como referencia los protocolos individuales de cada par de cebadores (*tst*, *siet*, *lukS*, *lukF*) empleados por Becker *et al.* (1998), Lautz *et al.* (2006) Futagawa-Saito *et al.* (2004), ya que no existe un protocolo desarrollado para la PCR-Múltiple utilizando estos cebadores juntos. Por lo cual, se realizaron varios PCR-Múltiples en gradiente con temperaturas de hibridación de 53°C, 55°C, 57°C y 59°C, y se evaluó la óptima formación de las bandas de cada producto de la PCR-Múltiple mediante la electroforesis.

### 3.4.3.1 Desarrollo de la PCR-Múltiple:

Debido a que no se ha establecido un protocolo de la PCR-Múltiple para estos genes de virulencia *siet*, *lukS*, *lukF* y *tst* en conjunto, se desarrolló un protocolo utilizando como referencia los protocolos individuales para la detección de cada gen según los autores referenciados. Por lo cual, se realizaron varias PCR-Múltiples en gradiente con temperaturas de hibridación de 53°C, 55°C, 57°C y 59°C, las cuales son temperaturas óptimas que pueden ampliarse hasta los 65°, y esto va depender de la cantidad de enlaces de hidrógeno que posean los cebadores (Lorenz, 2012). Posterior a eso, se evaluó la óptima formación de las bandas de cada producto de la PCR-Múltiple mediante la electroforesis.

Como podemos observar en la Figura 10, utilizamos un marcador de pesos moleculares de 1000 pares de bases (pb), el cual nos proporciona fragmentos de 100 pb hasta llegar a 1000pb. Esto sirve como marcador estándar para poder aproximar el tamaño de un producto de PCR, y generalmente es disponible comercialmente (Lorenz, 2012). De esta manera nos permite comparar dicho marcador con el número pares de bases de los genes que estamos buscando, ya que cada gen expresa un determinado número de pb, *siet* 359 pb, *lukS* 503 pb, *lukF* 572 pb, *tst* 445 pb.

Utilizamos la cepa de *Staphylococcus pseudintermedius* identificada como ST8 e hicimos una PCR individual para cada gen *siet*, *lukS*, *lukF* y *tst*, utilizamos esta cepa porque se detectó en ella los genes *siet*, *lukS* y *lukF* y se mandó a secuenciar para estar seguros de que realmente era el producto que estábamos buscando. Sin embargo, esta cepa dio negativo para el gen *tst*.

Es muy difícil obtener un control positivo para el gen *tst*, ya que en la literatura no se tienen tantos reportes de este gen en *S. pseudintermedius*, teniendo más reportes de este

gen en *S. aureus*. Por lo cual, utilizamos la cepa ATCC 43300 de *S. aureus*, buscando la presencia de este gen, utilizando los cebadores correspondientes, sin embargo, también dio negativo. Poder adquirir una cepa de *S. pseudintermedius* o *S. aureus* que nos sirva como control positivo para el gen *tst* es muy complicado de adquirir, pero utilizando los cebadores correspondientes certificados para el gen *tst* y basados en la literatura de estudios previos se procedió a buscar su detección en nuestros aislados de *Staphylococcus pseudintermedius*.

Como se evidencia en la Figura 10 se formaron cuatro grupos de 3 carriles, donde cada grupo tenía una temperatura de hibridación en gradiente resultado de la PCR-Múltiple, es decir, que iba desde los 53°C hasta los 59 °C por grupo, y cada grupo tenía 3 carriles y cada carril representaba una muestra de la cepa ST8 de *S. pseudintermedius* positiva a los genes *siet*, *lukS* y *lukF* respectivamente en orden creciente al número de pares de bases que estos genes poseen. En el carril 13 se corrió la muestra del producto de la PCR individual para el gen *tst* que utilizó una temperatura de hibridación de 59°C con los cebadores correspondientes a este gen, no evidenciando la formación de la banda de 445 pb, obteniendo un resultado negativo.

Posterior a la lectura electroforética de cada grupo de 3 muestras de la cepa ST8 de *S. pseudintermedius* que tenían temperaturas de hibridación distintas, evaluamos las características ideales que debería tener una PCR-Múltiple, las cuales son, una adecuada formación de bandas, bien coloridas, diferenciadas y sin productos inespecíficos (Bolívar *et al.*, 2014).

El procesamiento de todas las muestras en esta primera etapa tuvo las siguientes condiciones: un volumen final de 20µl, con una concentración final de 0.4µM de cada cebador (0.8 µl) ,10µl de 2X PCR HotStart MasterMix, 2.6µl de agua grado molecular - libre de nucleasas y 1µl de ADN puro. Los termocicladores de PCR calientan y enfrían

rápidamente la mezcla de la reacción preparada, eso permite la desnaturalización inducida por el calor del ADN, el alineamiento de los cebadores a sus cadenas complementarias a la plantilla de ADN y la elongación de los productos del PCR (Lorenz, 2012). Por lo cual una reacción comenzará con una etapa de desnaturalización inicial de 94°C durante 3 minutos. Lo siguiente será iniciar un número de ciclos que fluctúan entre los 25-35 (Lorenz, 2012). En esta primera etapa se utilizaron 35 ciclos de 94°C de desnaturalización durante 1 minuto, 53°C , 55°C, 57°C y 59°C de temperaturas de hibridación en gradiente durante 1 minuto y 72°C para la elongación durante 1 minuto, la elongación depende de la ADN polimerasa que se esté utilizando , en este caso utilizamos una *Taq* polimerasa que tiene un temperatura de alargamiento óptima de 70°C-80°C (Lorenz, 2012), y por último una elongación final de 72°C durante 3 minutos , que sirve para que poder finalizar la síntesis de muchos amplicones incompletos (Lorenz, 2012).

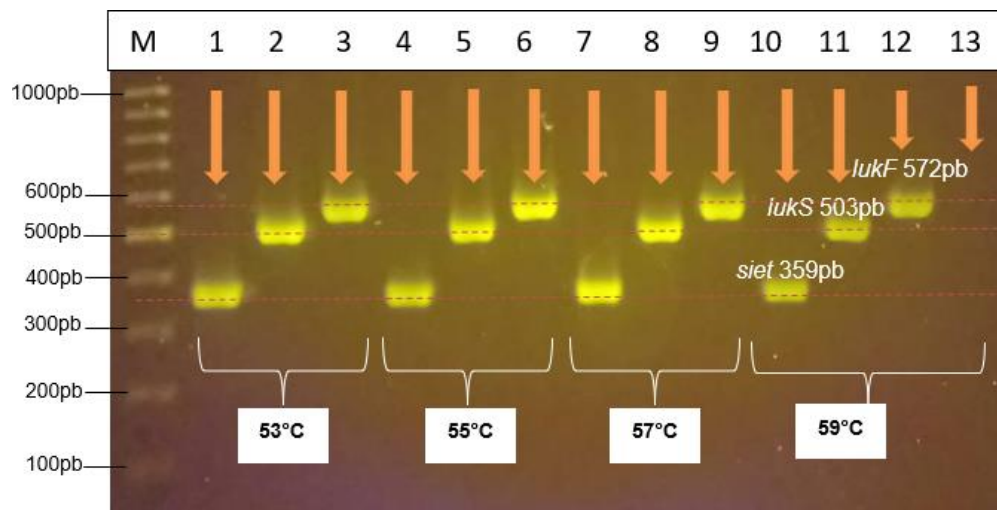


Figura 10. Gel de electroforesis de los productos del desarrollo de la PCR-Múltiple primera etapa **M**: Marcador de pesos moleculares (1000pb) ; **Carril 1**: muestra positiva al gen *siet* (53°C) ; **Carril 2**: muestra positiva al gen *lukS* (53°C); **Carril 3**: muestra positiva al gen *lukF* (53°C) ; **Carril 4**: muestra positiva al gen *siet* (55°C) ; **Carril 5**: muestra positiva al gen *lukS* (55°C) ; **Carril 6**: muestra positiva al gen *lukF* (55°C) ; **Carril 7**: muestra positiva al gen *siet* (57°C) ; **Carril 8**: muestra positiva al gen *lukS* (57°C) ; **Carril 9**: muestra positiva al gen *lukF* (57°C) ; **Carril 10** : muestra positiva al gen *siet* (59°C) ; **Carril 11** : muestra positiva al gen *lukS* (59°C) ; **Carril 12**: muestra positiva al gen *lukF* (59°C) ; **Carril 13** : muestra negativa al gen *tst* (59°C)



En la segunda etapa del desarrollo de la PCR-Múltiple, observando la formación de bandas positivas para los genes *siet*, *lukS* y *lukF*, procedimos a juntar en una sola reacción de PCR por cada muestra los cebadores de cada gen, es decir, juntamos los cebadores del gen *siet*, *lukS*, *lukF* y *tst*, buscando la aparición de las bandas específicas de acuerdo al número de pares de bases que cada gen posee.

Con los resultados de la primera etapa, decidimos utilizar una temperatura de hibridación de 55°C, ya que nos brindaba unas bandas bien coloridas y definidas de cada producto. Sin embargo por la cantidad de cebadores que íbamos a colocar en una sola reacción y tratando de disminuir la aparición de bandas inespecíficas y/o productos que no permitan diferenciar las bandas que estábamos buscando, decidimos disminuir la concentración de cada cebador desde 0.4 µM a 0.3 µM y 0.2 µM respectivamente, ya que al utilizar un mayor número de pares de cebadores por reacción, podría aumentar la aparición de productos inespecíficos debido al secuestro de componentes esenciales en la reacción, disminuyendo la eficiencia (Bolívar *et al.*, 2014). Así mismo, disminuimos la cantidad de ADN, diluyendo 1 µl de ADN puro con 9 µl de agua grado molecular- libre de nucleasas, de esta manera, se utilizó un volumen final de 20 µl, para una concentración de cada cebador de 0.4 µM (0.8 µl), 10 µl de HotStar MasterMix, 2.6 µl de agua grado molecular libre de nucleasas, 1 µl ADN puro; para una concentración de cada cebador de 0.3 µM (0.6 µl), 10 µl de HotStar MasterMix, 4.2 µl de agua grado molecular libre de nucleasas, 1 µl ADN diluido; y para una concentración de cada cebador de 0.2 µM (0.4 µl); 10 µl de HotStar MasterMix, 5.8 µl de agua grado molecular libre de nucleasas, 1 µl de ADN diluido.

Las condiciones del termociclado en esta segunda etapa fueron: una desnaturalización inicial de 94°C durante 3 minutos seguido por 35 ciclos de 94°C de desnaturalización durante 1 minuto, 55°C de hibridación durante 1 minuto y 72°C para la elongación

durante 1 minuto, con una elongación final de 72°C durante 3 minutos. Además, utilizamos un marcador de peso molecular de 1000 pb, pero con una particularidad, que éste marcador nos proporcionaba bandas desde 50 en 50 pb, hasta llegar a 500 pb, y luego de 100 en 100 pb hasta llegar a 1000 pb. Se decidió usar ese marcador de peso molecular, ya que los pesos moleculares de los genes que estábamos buscando se encuentran bien próximos, y para poder tener una mejor diferenciación entre cada banda, se optó por este marcador.

Posterior a la electroforesis de los productos de la PCR-Múltiple como muestra la Figura 11, observamos la formación de las bandas bien delimitadas y coloridas, y de acuerdo a cada concentración  $\mu\text{M}$  (micro molar) de cada par de cebadores utilizados y la cantidad de ADN que habíamos colocado en la PCR-Múltiple, evidenciamos que una concentración de 0.2  $\mu\text{M}$  de cada cebador con el ADN diluido, nos proporcionaba una mejor calidad en la visualización y diferenciación de las bandas en la PCR-Múltiple para los 3 genes *siet*, *lukS* y *lukF*. Sin embargo, se obtuvo un producto inespecífico de aproximadamente 1500 pb, por ello decidimos realizar una tercera etapa.

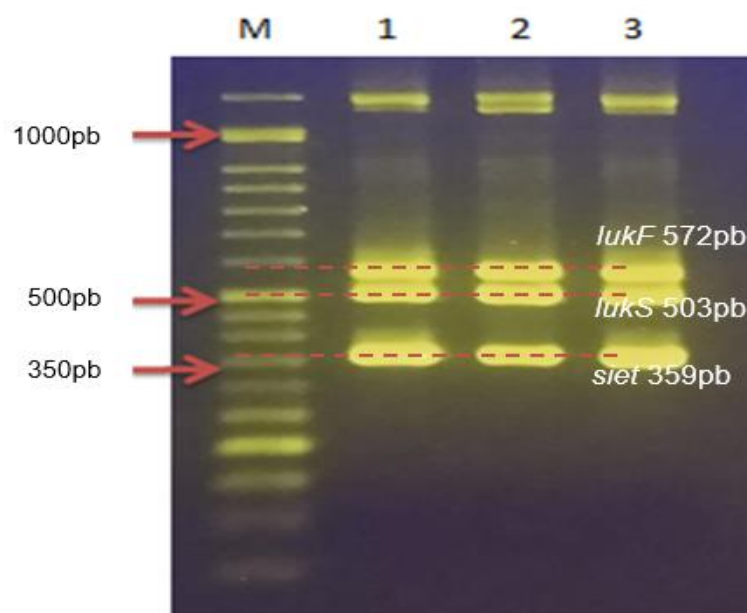


Figura 11. Gel de electroforesis de los productos del desarrollo de la PCR-Múltiple segunda etapa. **M**: Marcador de pesos moleculares (1000pb); **Carril 1**: muestra positiva a los 3 genes *siet*, *lukS*, *lukF*, a 0.3uM con ADN diluido; **Carril 2**: muestra positiva a los 3 genes *siet*, *lukS*, *lukF*, a 0.2uM con ADN diluido; **Carril 3**: muestra positiva a los 3 genes *siet*, *lukS*, *lukF* a 0.4uM con AND puro

En la tercera etapa se escogió una concentración para cada cebador de 0.2  $\mu\text{M}$ , aumentamos la temperatura de hibridación hasta 59°C, disminuimos la cantidad de ciclos de la PCR-Múltiple a 30, y utilizamos el ADN de cada muestra diluido en 9  $\mu\text{l}$  de agua grado molecular libre de nucleasas. Observando como representa la Figura 12, una total desaparición de las bandas inespecíficas que aparecieron en la etapa anterior y una visualización delimitada, colorida y específica para cada banda positiva a sus respectivos genes *siet*, *lukS* y *lukF*.

Con los resultados obtenidos mediante la electroforesis, se obtuvieron las condiciones adecuadas de los ciclos de la PCR-Múltiple para la detección de estos genes, teniendo unas bandas bien marcadas, delimitadas y sin productos inespecíficos, el cual se utilizó para el procesamiento de todas las muestras de este estudio. Se desarrolló el protocolo con una temperatura de hibridación de 59°C y se amplificó todas las muestras con las siguientes condiciones: un volumen final de 20 $\mu\text{l}$  con una concentración 0.2 $\mu\text{M}$  de cada cebador, 10 $\mu\text{l}$  de 2X PCR HotStart MasterMix ABM® ( 0.2 mM de dNTP's, 1.5 mM  $\text{MgCl}_2$  , 0.5U HotStart DNA Polymerase) , 5.8 $\mu\text{l}$  de agua grado molecular -libre de nucleasas y 1 $\mu\text{l}$  de ADN ( 1  $\mu\text{l}$  ADN puro diluido con 9  $\mu\text{l}$  de agua grado molecular-libre de nucleasas) (Cuadro 3) . Las condiciones del termociclado incluyeron una etapa de desnaturalización inicial de 94°C durante 3 minutos seguido por 30 ciclos de 94°C de desnaturalización durante 1 minuto, 59°C de hibridación durante 1 minuto y 72°C para la elongación durante 1 minuto, con una elongación final de 72°C durante 3 minutos (Cuadro 4).

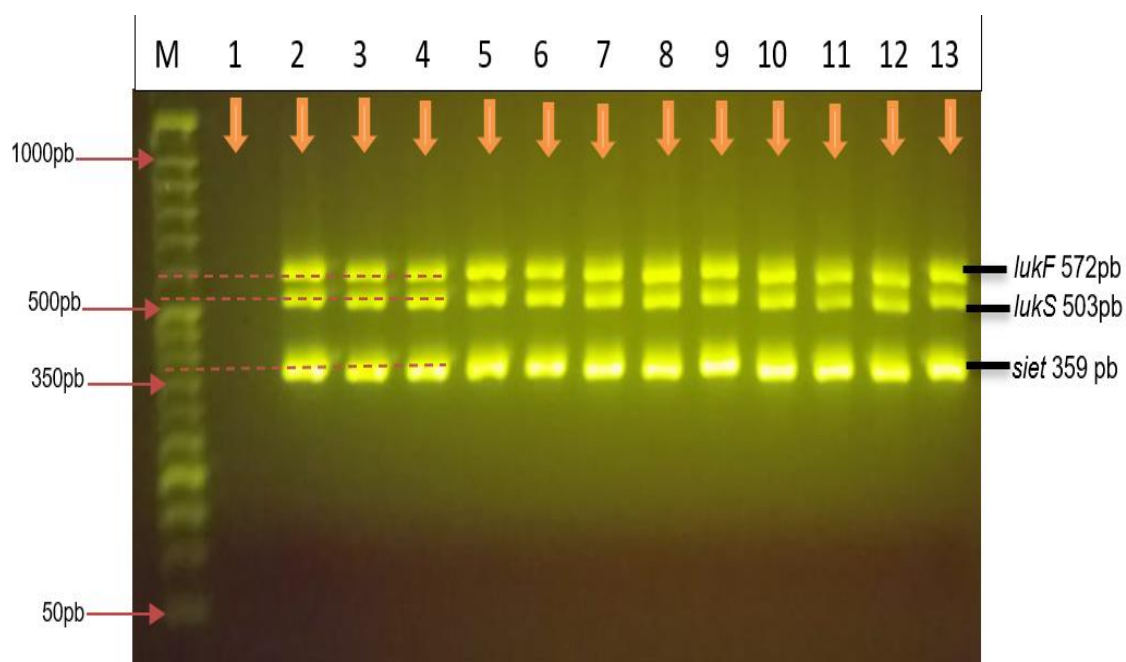


Figura 12. Gel de electroforesis de los productos del desarrollo de la PCR-Múltiple tercera etapa final M: Marcador de pesos moleculares de 1000 pb; **Carril 1**: blanco control negativo; **Carril 2-13**: muestras positivas para los 3 genes de virulencia asociados a toxina *siet* 359 pb, *lukS* 503pb y *lukF* 572pb, ninguna muestra positiva para gen *tst* 445 pb.

Cuadro 2. Secuencia de cebadores para los genes *tst*, *siet*, *lukS*, *lukF*

Cebadores		Secuencia 5' → 3'	Producto	Referencia
<i>tst</i>	<i>forward</i>	AAG CCC TTT GTT GCT TGC G	445pb	Becker <i>et al.</i> , 1998
	<i>reverse</i>	ATC GAA CTT TGG CCC ATA CTT T		
<i>siet</i>	<i>forward</i>	ATG GAA AAT TTA GCG GCA TCT GG	359pb	Lautz <i>et al.</i> , 2006
	<i>reverse</i>	CCA TTA CTT TTC GCT TGT TGT GC		
<i>lukS</i>	<i>forward</i>	TGT AAG CAG CAG AAA ATG GGG	503pb	Futagawa-Saito <i>et al.</i> , 2004
	<i>reverse</i>	GCC CGA TAG GAC TTC TTA CAA		
<i>lukF</i>	<i>forward</i>	CCT GTC TAT GCC GCT AAT CAA	572pb	Futagawa-Saito <i>et al.</i> , 2004
	<i>reverse</i>	AGG TCA TGG AAG CTA TCT CGA		

Cuadro 3. Mix para una reacción de PCR-Múltiple

	Concentración inicial	Concentración final	Volumen
H2O libre de nucleasas			5.8 ul
primer forward <i>siet</i>	10 uM	0.2 uM	0.4 ul
primer reverse <i>siet</i>	10 uM	0.2 uM	0.4 ul
primer forward <i>luks</i>	10 uM	0.2 uM	0.4 ul
primer reverse <i>luks</i>	10 uM	0.2 uM	0.4 ul
primer forward <i>lukf</i>	10 uM	0.2 uM	0.4 ul
primer reverse <i>lukf</i>	10 uM	0.2 uM	0.4 ul
primer forward <i>tst</i>	10 uM	0.2 uM	0.4 ul
primer reverse <i>tst</i>	10 uM	0.2 uM	0.4 ul
Master Mix	2X	X	10 uL
ADN diluido*	20 ng/uL a más		1ul
Volumen final			20 uL

\* 1ul DNA puro con 9 ul H2O libre de nucleasas

Cuadro 4. Condiciones de ciclos térmicos de la PCR-Múltiple

	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>
<b>Desnaturalización inicial</b>	94°C	3 min
<b>Ciclo: 30X*</b>	*94° C	1 min
	*59° C	1 min
	*72° C	1 min
<b>Extensión final</b>	72° C	3 min

#### 3.4.4. Electroforesis

Para la corrida electroforética, se preparó el gel de agarosa al 1.8% (0.9 gramos de Agarosa en 50 ml de TBE al 0.5X). Luego de ello, se colocó el gel en la cámara de electroforesis y se le añadió buffer TBE al 0.5X. Los productos de la PCR-Múltiple se mezclaron con el buffer de carga Safe-Green *ABM*® (1µl del buffer de carga con 5µl de cada producto) para posteriormente ser colocados en su respectivo pocillo en el gel. Así mismo, se colocó en el gel un marcador de peso molecular 100bp Opti-DNA Marker cat#G016, un blanco control, un control positivo para los genes *siet*, *lukS*, *lukF*, y se corrió durante 90 minutos a 70 voltios (Cuadro 5). Los resultados de la corrida electroforética fueron analizados mediante un transiluminador de luz azul SafeVIEW.

Cuadro 5. Condiciones de la corrida electroforética

<b>Gel</b>	<b>1.8 % *</b>
<b>SafeGreen</b>	1:5** ul
<b>Voltaje</b>	70 V
<b>Corriente</b>	70
<b>Tiempo</b>	90 minutos

\* 0.9 gramos de Agarosa en 50 ml de TBE 0.5x  
 \*\*(Colorante Fluorescente: producto de PCR)

### **3.4.5. Secuenciamiento de los productos amplificados de *S. pseudintermedius* positivos a los genes de virulencia asociados a toxinas *siet*, *lukS* y *lukF*.**

Para corroborar que los productos amplificados sean específicos de estos genes en *Staphylococcus pseudintermedius*, se mandó a secuenciar tres productos de la cepa ST8 que corresponden a los amplicones de los genes *siet*, *lukS* y *lukF*, los cuales dieron como resultado productos de 359, 503 y 572 pb respectivamente. El secuenciamiento fue realizado mediante la empresa Macrogen, Inc. Corea del Sur.

Al recibir los datos de Macrogen, en primer lugar, se realizó la limpieza de ruido de los electroferogramas, tanto del amplicón del primer *forward* como *reverse* de todos los genes con el programa Chromas. Seguido a la limpieza, se procedió a alinear ambas secuencias *forward* y *reverse* para generar la secuencia del amplicón completo, para esto, se usaron los programas BioEdit y EditSequence.

Posteriormente, con la secuencia ya completa, se realizó el empalme y se obtuvo la secuencia consenso con los programas MegaAlign. Por último, se procedió a comprobar que la secuencia sea correcta mediante análisis con BLAST, el cual es un programa informático de alineamiento de secuencias que nos permite comparar nuestra secuencia con otras secuencias para el mismo producto del gen que están almacenadas en una base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI).



#### IV. RESULTADOS

Del total de los aislados de muestras clínicas remitidas al Laboratorio de Microbiología, Sección Bacteriología y criopreservados durante el periodo del 2016 al 2018 (141 aislados) de piodermas y otitis externas caninas de *Staphylococcus pseudintermedius*, se detectó que el 98.58% de estas cepas presentan tres genes de virulencia asociados a toxinas (*siet*, *lukS*, *lukF*).

Por otro lado, la presencia de los genes *siet*, *lukS* y *lukF* fueron de 99.29%, 98.58% y 99.29% respectivamente (Cuadro 6). Además, dos muestras del total solo presentaron un gen de virulencia asociado a toxinas, una solo presentó el gen *siet* y la otra el gen *lukF* (Figura 13).

No se detectó la presencia del gen *tst* (0%) en ninguna de las muestras aisladas de *Staphylococcus pseudintermedius* de piodermas y otitis.

Cuadro 6. Distribución de los genes asociados a toxinas en aislados de *S. pseudintermedius* en dos sitios de infección.

Enfermedad	N° aislados	<i>tst</i>	<i>siet</i>	<i>lukS</i>	<i>lukF</i>
		+(%)	+(%)	+(%)	+(%)
Otitis externa	17	0	16(99)	16(99)	17(100)
Pioderma (piel)	124	0	124(100)	123(99)	123(99)
Total	<b>141</b>	<b>0</b>	<b>140(99)</b>	<b>139(99)</b>	<b>140(99)</b>

Cuadro 7. Resultados de la detección de genes de virulencia asociados a toxinas mediante PCR-Múltiple de los 141 aislados de *S. pseudintermedius* de piodermas y otitis caninas por año de aislamiento.

		Año de aislamiento			
		2016	2017	2018	Total
Genes	<i>siet</i>	41	47	52	140
	<i>lukS</i>	41	46	52	139
	<i>lukF</i>	41	46	53	140
	<i>tst</i>	0	0	0	0
Total de aislados		<b>41</b>	<b>47</b>	<b>53</b>	<b>141</b>

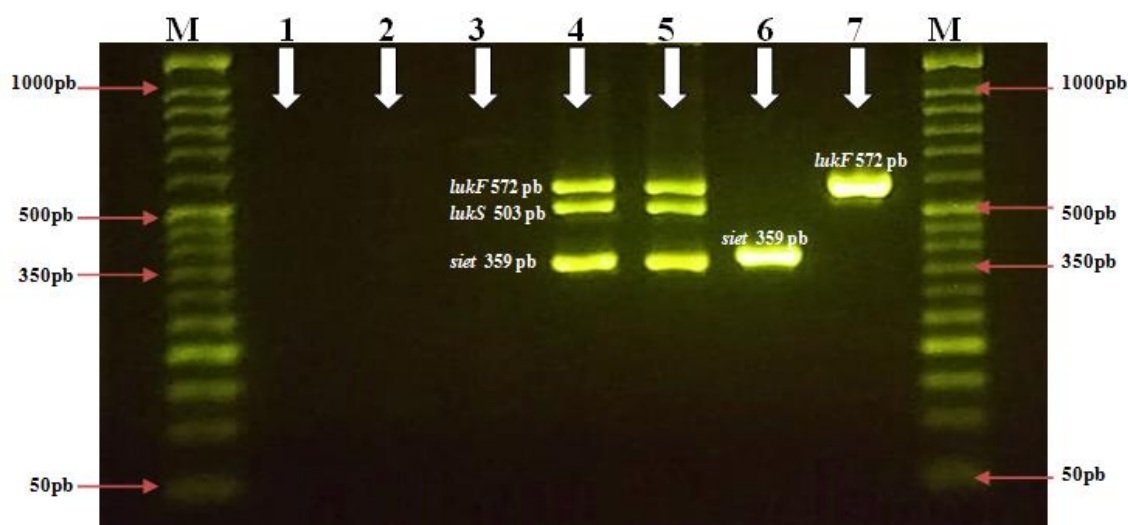


Figura 13. Gel de electroforesis de los productos de la PCR-Múltiple. **M**: Marcador de peso molecular 100bp. **Línea 1**: Blanco de reacción. **Línea 2**: Control Negativo *E. coli* ATCC 8739. **Línea 3**: Control Negativo *Bacillus subtilis* ATCC 6633. **Línea 4**: Cepa ST8 de *Staphylococcus pseudintermedius* positivo a tres genes de virulencia. **Línea 5**: Cepa G94 de *Staphylococcus pseudintermedius* positivo a tres genes de virulencia. **Línea 6**: Cepa S36 de *Staphylococcus pseudintermedius* positivo a gen *siet*. **Línea 7**: Cepa S010 de *Staphylococcus pseudintermedius* positivo a gen *lukF*.

Realizado el alineamiento con el programa MegaAlign Pro de las secuencias (**ANEXOS 6,7,8**) y el análisis de distancias para obtener el porcentaje de identidad de dichos genes en comparación con otras secuencias para el mismo gen en otras especies bacterianas disponibles en el banco de genes del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) se obtuvo lo siguiente:

- a) Para el producto amplificado del gen *siet* de 359 pb la cepa ST8 obtuvo un 100% de identidad con el producto del gen *siet* de las cepas de *S. pseudintermedius* HKU10-03 con número de accession CP002439.1 y de *S. intermedius* (exfoliative toxine) con número de accession BN000819.1. (Tabla 1)

Tabla 1. Análisis de distancias del producto amplificado del gen *siet*

Percent Identity					
Divergence	1	2	3	4	
	1	100.0	100.0	69.5	1
	2	0.0	100.0	69.5	2
	3	0.0	0.0	69.5	3
	4	39.5	39.5	69.5	4
	1	2	3	4	

Consenso Siet.seq  
 S. pseud HKU10-03 CP002439.1.seq  
 S. intermed (exfoliative toxine) BN0008  
 S. cohnii ATCC 29974 LT963440.1.seq

- b) Para el producto amplificado del gen *lukS* de 503 pb la cepa ST8 obtuvo un 100% de identidad con el producto del gen *lukS* de la cepa de *S. pseudintermedius* HKU 10-03 con número de accession CP002439.1 y un 99.40 % de identidad con el producto del gen *lukS* de la cepa *S. intermedius* (B62) con número de accession X79188.1. (Tabla 2)

Tabla 2. Análisis de distancias del producto amplificado del gen *lukS*

Percent Identity					
Divergence	1	2	3	4	
	1	100.0	99.4	45.3	1
	2	0.0	99.4	45.3	2
	3	0.6	0.6	45.9	3
	4	98.8	98.8	96.5	4
	1	2	3	4	

Consenso LukS.seq  
 S. pseud HKU10-03  
 S.intermed lukS  
 S. delphini strain NCTC12225

- c) Para el producto amplificado del gen *lukF* de 572 pb la cepa ST8 obtuvo un 100% de identidad con el producto del gen *lukF* de la cepa de *S. pseudintermedius* strain 063228 con número de accession CP015626.1 y un 99.83 % de identidad con el producto del gen *lukF* de la cepa *S. intermedius* (B62) con número de accession X79188.1. (Tabla 3)

Tabla 3. Análisis de distancias del producto amplificado del gen *lukF*

Percent Identity							
Divergence	1	2	3	4			
	1		100.0	99.8	80.7	1	Consenso LukF.seq
	2	0.0		99.8	80.7	2	S. pseud CP015626.1.seq
	3	0.2	0.2		80.7	3	S. intermed X79188.1.seq
	4	22.4	22.4	22.4		4	S. aureus CP022291.1.seq
		1	2	3	4		

Los productos amplificados de los genes *siet*, *lukS* y *lukF* del aislado ST8 fueron ingresadas al banco de genes del NCBI con números de accession MT451971, MT451973 y MT451972 respectivamente.

## V. DISCUSIÓN

A nivel mundial la pioderma y otitis son enfermedades multifactoriales de la piel que afectan a los caninos, y, representan la gran mayoría de los problemas dermatológicos atendidos en la práctica clínica veterinaria diaria (Sánchez *et al.*, 2011; Cesarela, 2013; Gortel, 2013). El estafilococo es el agente que se detecta con mayor frecuencia en estas patologías, es así, que se tienen reportes de frecuencias de infecciones por *Staphylococcus* sp. en caninos con diagnóstico de pioderma similares en diferentes países de América. Así, tenemos estudios realizados en Argentina donde se reporta un 90% (Giacoboni *et al.*, 2017), en Colombia se documenta un 86% (Castellanos *et al.*, 2011), Costa rica reportó un 88% (Romero, 2014), y estudios realizados en Perú según Antúnez *et al.*, (2009) detectó un 78.3% de prevalencia de este agente bacteriano. Fitzgerald *et al.*, (2009) ha reportado que el *Staphylococcus pseudintermedius* es el agente bacteriano con mayor índice de frecuencia en piodermas

caninas y no el *S. intermedius* como se tenía reportado anteriormente. Además, según Bond y Loeffler, (2012) refiere al *S. pseudintermedius* como el principal patógeno con un gran potencial zoonótico causante de las piodermas en caninos. Por ello, muchas investigaciones vienen realizando la caracterización fenotípica, genética, resistencia antimicrobiana y de virulencia para determinar mejor sus posibles implicancias en la patogénesis de las piodermas en caninos y su importancia en la salud pública.

El presente estudio tuvo como objetivo la detección de genes de virulencia (*tst*, *siet*, *lukS* y *lukF*) asociados a toxinas en *Staphylococcus pseudintermedius* aislados de otitis y piodermas de caninos domésticos mediante PCR-Múltiple. Sin embargo, no se ha descrito hasta la fecha una PCR-Múltiple para la detección de los genes *siet*, *tst*, *lukS* y *lukF* de manera conjunta. Por ello, se tomó las referencias de los protocolos individuales usados para cada par de cebadores de cada gen empleados por Becker *et al.* (1998), Lautz *et al.* (2006) Futagawa-Saito *et al.* (2004) y se desarrolló una PCR-Múltiple para estos genes, cuyos productos amplificados fueron cotejados mediante un secuenciamiento genético obteniéndose que las secuencias de los productos amplificados de los genes asociados a toxinas *siet*, *lukS* y *lukF* obtuvieron un 100% de identidad con secuencias de *S. pseudintermedius* para cada gen evaluado, utilizando la base de datos del Banco de Genes (GenBank).

En este estudio se detectó que el 98.58% de todos los aislados de *Staphylococcus pseudintermedius* tenían al menos tres genes de virulencia asociados a toxinas (*siet*, *lukS*, *lukF*). Así mismo, se detectó la presencia de los genes *siet*, *lukS* y *lukF* en un 99.29%, 98.58% y 99.29% en los aislados de *S. pseudintermedius* respectivamente, y no se detectó la presencia del gen *tst*. Estos porcentajes elevados son similares a otros trabajos donde también utilizaron la detección simultánea de ocho genes de *S. pseudintermedius* relacionados a este agente bacteriano (Becker *et al.*, 1998; Pitchenin *et al.*, 2017). Nosotros hemos hecho la detección conjunta de estos cuatro genes con resultados muy similares.

La alta frecuencia de genes *siet* (99%), *lukF* (99%) y *lukS* (99%) observados en este estudio fueron relativamente superiores a los datos de otros estudios, donde según Pitchenin *et al*, (2017) en Brasil detectó un 86%, 90% y 90% respectivamente de estos genes en aislados de *S. pseudintermedius* en piodermas de caninos, y un 89%, 89% y 94% respectivamente de estos genes en los aislados de *S. pseudintermedius* en otitis caninas. De manera similar, los resultados obtenidos para el gen *siet* en este estudio fueron relativamente superiores a los encontrados por Youn *et al.*, (2011) donde encontró un 93.3% de prevalencia de este gen en aislados de *S. pseudintermedius* de caninos con enfermedades de piel y oído en Korea. Otros estudios reportan resultados similares al presente estudio, Sareyyüpoğlu *et al.*, (2013) detectó un 100% del gen *siet* y Ruzauskas *et al.*, (2016) un 91%, 25% y 25% de cepas conteniendo el gen *siet*, *lukS* y *lukF* respectivamente en piodermas, y un 60%, 40% y 40% de los genes *siet*, *lukS* y *lukF* en otitis. Esta alta frecuencia podría explicarse a la considerable variabilidad genética que podrían tener los aislados y que provienen de animales clínicamente enfermos, puesto que no se sabe o no se conoce el perfil de virulencia en aislados de animales sanos Pitchenin *et al*, (2017). En solo dos aislados se detectó un gen (*siet* y *lukF*), resultados relativamente similares al estudio de Kmieciak y Szewczyk (2018), en el cual solo se identificó cuatro aislados con un de gen de las toxinas mencionadas.

En el presente estudio no se detectó la presencia del gen *tst*, resultados similares a los que fueron obtenidos por Kmieciak y Szewczyk (2018), donde tampoco detectaron la presencia de este gen. Sin embargo, Pitchenin *et al.*, (2017) reporta un 44% de presencia en cuadros de otitis y un 10% en piodermas caninas en Brasil. Estos resultados podrían explicarse debido a que este gen se halla con mayor frecuencia en cepas de *Staphylococcus aureus*, y no se tienen más reportes de la detección de este gen en cepas de *S. pseudintermedius* en América Latina, que implicaría una evolución de este microorganismo al adquirir este gen que podría estar asociado a una mayor virulencia. Además, estas discrepancias pueden deberse a la considerable variabilidad genética que evolutivamente procede en las bacterias, existiendo patrones genéticos con una gran variedad de mecanismos que le permiten obtener y perder



genes, cuya expresión genética está gobernada por estímulos moleculares y concentraciones en el ambiente en el que se encuentre, para optimizar el gasto energético. Presentando una capacidad adaptativa alta, determinada por distintas vías metabólicas, siendo la más importante la de regulación, que controla la activación o desactivación de los procesos de transcripción de un grupo de genes cuyos productos tienen funciones correlacionadas y organizadas en cierta región del genoma. Dicha forma de organización se denomina operón, y permite la administración óptima de reservas de energía, la cual está compuesta por un promotor que viabiliza la regulación genética mediado por enzimas de una vía metabólica y por una secuencia que finaliza la transcripción (Martínez, 2005; Falush, 2009; Chaudhry y Patil, 2019). Además, el estudio realizado por Alvarez, (2019) en piodermas no reportó ningún *S. aureus* presente en perros de la ciudad de Lima, esta ausencia en la microbiota de piel del perro podría explicar que *S. pseudintermedius* no tendría la oportunidad de obtener el gen *tst* característico de *S. aureus*. Sin embargo, debido a que no se obtuvo un control positivo para el gen *tst*, no podemos confirmar con el rigor adecuado la ausencia del gen. Sin embargo, la utilidad de los cebadores empleados han sido referenciados en estudios previos, y las condiciones de calidad como de los otros cebadores utilizados en el presente estudio para la detección de los demás genes de toxinas, fueron similares.

Los resultados del presente estudio, evidenciando la presencia de estos tres genes de virulencia asociados a toxinas (*siet*, *lukS* y *lukF*) nos da un panorama del potencial patogénico genético que poseen nuestras cepas de *Staphylococcus pseudintermedius* circulantes en piodermas y otitis en caninos de nuestro país. A su vez, nos lleva a considerar el potencial riesgo que significaría la colonización por estas cepas que tienen genes asociados a toxinas, como es el caso del gen *siet*, el cual estuvo presente en el 99% de cepas y es de marcada importancia dentro de la infección por *S. pseudintermedius*, debido a que esta toxina induce a la inestabilidad desmosomal, que permite la unión de las células epiteliales, que ha sido demostrado en otros estudios in vitro en animales y humanos (Bannoehr, 2012). Además,

según Pulgarin, 2005 y Benito, 2016, han demostrado que los genes *lukS* y *lukF* están involucrados en la destrucción leucocitaria, hemolítica y daño tisular al organismo. Por ello, la elevada presencia de aislados positivos para al menos tres genes de virulencia asociados a toxinas, sugeriría que estas toxinas puedan desempeñar un rol importante en la infección causada por *Staphylococcus pseudintermedius* y posiblemente tengan relación con la cronicidad de las lesiones cutáneas y otitis externas en perros. Sin embargo, se requieren de más estudios para demostrar esta posible relación, para determinar el mecanismo fisiopatológico involucrado en las piodermas en perros.

Finalmente, estos resultados sientan una base del potencial patogénico genético de las cepas de *Staphylococcus pseudintermedius* circulantes en nuestro país, en base a ello se podrán realizar otros estudios para una adecuada determinación de la implicancia de estos factores de virulencia involucrados en cuadros de piodermas y otitis. Debido a que la caracterización fenotípica y genética del agente infeccioso es la base para cualquier estudio posterior y poder entender la fisiopatología de una determinada enfermedad. Además, los resultados del presente estudio refuerzan la gran importancia en salud pública de la presencia de estos genes que podrían tener implicancias en el cambio de la microbiota normal de la piel en el ser humano (Kmieciak y Szewczyk, 2018), debido al contacto muy cercano que existe entre el hombre y el perro, que ha evidenciado la transmisión de *Staphylococcus pseudintermedius* entre estas dos especies (Boost *et al.*, 2008; Hanselman *et al.*, 2009).

## VI. CONCLUSIONES

- ✓ El 98.58% de *Staphylococcus pseudintermedius* poseen los tres genes de virulencia de las toxinas *siet*, *lukS* y *lukF* en los aislados de muestras clínicas de piodermas y otitis caninas remitidas al Laboratorio de Bacteriología de la FMV-UMSM en el periodo 2016-2018.
- ✓ Los aislados de *S. pseudintermedius* tanto de piodermas y de otitis poseen los genes *siet*, *lukS* y *lukF* en porcentajes altos en el presente estudio.

## VII. LITERATURA CITADA

1. **Alvarez L. 2019.** Detección de *Staphylococcus pseudintermedius* y *Staphylococcus aureus* aislados de piodermias caninas mediante PCR-RFLP. Tesis para optar el Título Profesional de Médico Veterinario. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 61p
2. **Andrey D, Renzoni A, Monod A, Lew D, Cheung A, Kelley W. 2010.** Control of the *Staphylococcus aureus* Toxic Shock tst Promoter by the Global Regulator SarA. Switzerland. Journal of bacteriology. Vol. 192(22). 6077–6085.
3. **Antúnez O, Calle S, Morales S, Falcón N, Pinto C. 2009.** Frecuencia de patógenos aislados en casos clínicos de dermatitis bacteriana canina y su susceptibilidad antibiótica. Rev Inv Vet Perú; 20(2): 332-338.
4. **Arévalo C, Arpi L. 2015.** Evaluación de la susceptibilidad antibiótica de *Staphylococcus aureus* en otitis externa canina, en casos clínicos de tres clínicas veterinarias de la ciudad de Cuenca. Tesis de Grado al Título de Médico Veterinario Zootecnista. Cuenca: Universidad de Cuenca. 72p.
5. **Balazs Mayanz, Verónica. 2012.** Pioderma en el canino. REDVET vol. 13 [Internet], [30 noviembre 2019]. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/636/63623410016.pdf>
6. **Bannoehr J, Ben Zakour NL, Waller AS, Guardabassi L, Thoday KL, Van den Broek AH, Fitzgerald JR. 2007.** Population genetic structure of the *Staphylococcus intermedius* group: insights into *agr* diversification and the emergence of methicillin-resistant strains. Journal of bacteriology, 189(23). 8685–8692.
7. **Bannoehr J, Franco A, Iurescia M, Battisti A, Fitzgerald JR. 2009.** Molecular Diagnostic Identification of *Staphylococcus pseudintermedius*. Journal of Clinical Microbiology. 47(2): 469-471.
8. **Bannoehr J, Guardabassi L. 2012.** *Staphylococcus pseudintermedius* in the dog: taxonomy, diagnostics, eology, epidemiology and pathogenicity. Veterinary Dermatology. 23(4): 16p
9. **Becker K, Roth R, Peters G. 1998.** Rapid and Specific Detection of Toxigenic *Staphylococcus aureus*: Use of Two Multiplex PCR Enzyme Immunoassays for Amplification and

Hybridization of Staphylococcal Enterotoxin Genes, Exfoliative Toxin Genes, and Toxic Shock Syndrome Toxin 1 Gene. Journal of Clinical Microbiology. v(36) p. 2548–2553

10. **Benito D. 2016.** Líneas genéticas, virulencia y resistencia a antibióticos en *Staphylococcus aureus* de diferentes orígenes. Análisis de marcadores de adaptación al huésped y comportamiento en *Caenorhabditis elegans*. Tesis Doctoral. Logroño: Universidad de La Rioja. 261p.
11. **Bolivar A, Rojas A, Garcia-Lugo P. 2014.** PCR Y PCR-Múltiple: parámetros críticos y protocolo de estandarización. *Avan Biomed*. Vol 3(1): 25-33.
12. **Bond R, Loeffler A. 2012.** What's happened to *Staphylococcus intermedius*? Taxonomic revision and emergence of multidrug resistance. *Journal of Small Animal Practice*. 53: 147-154.
13. **Boost MV, O'Donoghue MM, James A. 2008.** Prevalence of *Staphylococcus aureus* carriage among dogs and their owners. *Epidemiol Infect* 136(7): 953–964
14. **Brooks G, Carroll K, Butel J, Morse S, Mietzner T. 2010.** Microbiología médica. 25a. edición. México: McGraw-Hill. 815p.
15. **Camussone C, Calvino L. 2013.** Factores de virulencia de *Staphylococcus aureus* asociados con infecciones mamarias en bovinos: relevancia y rol como agentes inmunógenos. *Rev Argent Microbiol*. 45(2): 119-130.
16. **Castellanos I, Rodríguez G, Santos R. 2011.** Aislamiento e identificación bioquímica de microorganismo bacterianos a partir de infecciones de piel en caninos. *Rev. Med. Vet* (22): 21-30.
17. **Cerasela V. 2013.** Bacterial pyoderma in dogs. Bucharest, Roumania. *Bulletin UASVM, Veterinary Medicine*, 70(2): 321 – 327.
18. **Cervantes E, García R, Salazar P. 2014.** Características generales de *Staphylococcus aureus*. *Rev Latinoam Patol Clin Med Lab* 2014;61 (1): 28-40
19. **Chaudhry V, Patil P. 2019.** Evolutionary insights into adaptation of *Staphylococcus haemolyticus* to human and non-human niches. *Genomics*. doi: 10.1016/j.ygeno.2019.11.018

20. **Chans G. 2002.** Estafilococos. Instituto de Higiene.Cefa. [Internet], [11 Diciembre 2019]  
Disponible en: <http://www.higiene.edu.uy/cefa/Libro2002/Cap%2017.pdf>
21. **Corredor L, Moncayo J, Santacruz J, Álvarez A. 2011.** Detección de genes de toxinas pirogénicas y toxinas exfoliativas en aislamientos clínicos de *Staphylococcus aureus* en Colombia. Colombia. Investigaciones Andina. N° 25. V 14; 126 p.
22. **DePaulis A. 2017.** GRUPO *Staphylococcus intermedius*: PATÓGENO EMERGENTE EN INFECCIONES HUMANAS. IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA Y GENOTIPIFICACIÓN. Boletín AAM. [Internet], [30 noviembre 2019].  
Disponible en: <https://www.aam.org.ar/descarga-archivos/boletin217.pdf>
23. **Deurenberg R, Nieuwenhuis R, Driessen C, London N, Stassen F, Tiel F, Stobberingh E, Vink C. 2005.** The prevalence of the *Staphylococcus aureus* *tst* gene among community- and hospital-acquired strains and isolates from Wegener's Granulomatosis patients. Netherlands.El Sevier. FEMS Microbiology Letters 245: 185–189.
24. **Falush D. 2009.** Toward the Use of Genomics to Study Microevolutionary Change in Bacteria. PLoS Genetics. V5(10) .5p .doi: 10.1371/journal.pgen.1000627
25. **Fitzgerald JR. 2009.** The *Staphylococcus intermedius* group of bacterial pathogens: species re-classification, pathogenesis and the emergence of methicillin resistance. Vet Dermatol 20(5-6): 490-495.
26. **Forbes B, Sahm D, Weissfeld A. 2009.** Bailey & Scott: Diagnostico Microbiológico. 12ª ed. Buenos Aires: Médica Panamericana. 1026p
27. **Frank LA, Kania SA, Kirzeder EM, Eberlein LC, Bemis DA. 2009.** Risk of colonization or gene transfer to owners of dogs with methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. Vet Dermatol 20, 496-501.
28. **Fraser JD, Proft T. 2008.** The bacterial superantigen and superantigen-like proteins. Immunol Rev 225: 226-243.
29. **Futagawa-Saito K, Sugiyama T, Karube S, Sakurai N, BaThein W, Fukuyasu T. 2004.** Prevalence and Characterization of Leukotoxin-Producing *Staphylococcus intermedius* in Isolates from Dogs and Pigeons. J Clin. Microbiol.42: 5324- 5326.

30. **Garbacz K, Piechowicz L, Haras K. 2013.** Pathogenicity potential of *Staphylococcus pseudintermedius* strains isolated from canine carriers and from dogs with infection signs. *Virulence* 4: 255-259.
31. **Giacoboni GI, Vinocur F, Fauret N, Grandinetti J, Manzuc P. 2017.** Detección de *Staphylococcus pseudintermedius* resistentes a meticilina y a otros antimicrobianos de uso habitual en la clínica en piodermias caninas. *Analecta Vet* 2017; 37 (2):19-24
32. **Gómez A. 2006.** *Staphylococcus*: las ramificaciones de un racimo. Asociación Colombiana de Infectología. Vol. 10 (3):157-159.
33. **Gómez-Sanz E, Torres C, Lozano C, Sáenz Y, Zarazaga M. 2011.** Detection and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in healthy dogs in La Rioja, España. *Comp Immunol Microb* 34: 447-453.
34. **González D. 2015.** Posible relación existente entre la presencia de toxinas y la sensibilidad a antibióticos en cepas de *Staphylococcus aureus*. Trabajo Fin de Grado. Tenerife: Universidad de La Laguna. 20p.
35. **Gortel K. 2013.** Recognizing Pyoderm, More Difficult than it May Seem. *Vet Clin Small Anim* 43: 17-19p.
36. **Hanselman B, Kruth S, Rousseau J, Weese S. 2009.** Coagulase positive staphylococcal colonization of humans and their household pets. *Can vet J* 50 (9): 954-958.
37. **Hnilica KA, Patterson AP. 2017.** Small animal dermatology: a color atlas and therapeutic guide. 4<sup>a</sup> ed. Missouri: Elsevier. 652p.
38. **Iyori K, Futagawa-Saito K, Hisatsune J, Yamamoto M, Sekiguchi M, Ide K, Son WG, Olivry T, Sugai M, Fukuyasu T, Iwasaki T, Nishifuji K. 2011.** *Staphylococcus pseudintermedius* exfoliative toxin EXI selectively digests canine desmoglein 1 and causes subcorneal clefts in canine epidermis. *Vet Dermatol* 22: 319-326.
39. **Junjappa RP, Desai SN, Roy P, Raj JR, Durgaiah M, Vipra A, Satyanarayana SK, Shankara N, Basingi SM, Bhat JJ, Hariharan S, Sriram B, Padmanabhan S. 2013.** Efficacy of anti-staphylococcal protein P128 for the treatment of canine pioderma: potential applications. Bangalore, India. *Vet Res Commun* .V 37:217-228.

40. **Kmiecik Wioletta , Szewczyk Eligia. 2018.** Are zoonotic *Staphylococcus pseudintermedius* strains a growing threat for humans? *Folia Microbiologica* (2018) 63:743–747
41. **Lautz S, Kanbar T, Alber J, Lämmle C, Weiss R, Prenger-Berninghoff E, 2006.**  
Dissemination of the gene encoding exfoliative toxin of *Staphylococcus intermedius* among strains isolated from dogs during routine microbiological diagnostics. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* ; 53:434–438.
42. **Lorenz T. 2012.** Polymerase Chain Reaction: Basic protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. *Journal of Visualized Experiments*, (63).doi: 10.3791/3998
43. **Maali Y, Badiou C, Martins-Simões P, Hodille E, Bes M, Vandenesch F, Lina G, Diot A, Laurent F, Trouillet-Assan S. 2018.** Understanding the Virulence of *Staphylococcus pseudintermedius*: A Major Role of Pore-Forming Toxins. France. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. V 8. Article 221. 10 p
44. **Manzuc P, Nolasco L, Fogel F. 2011.** Enfermedades del oído en perros y gatos. Otitis externa: factores primarios y perpetuantes. Argentina. *Inter-Médica*. Cap 3: 46-47.
45. **Markey B, Leoanrd F, Archambault M, Cullinane A, Maguire D. 2013.** *Clinical Veterinary Microbiology*. 2<sup>nd</sup> Ed: Elsevier. 920p.
46. **Martínez S. 2005.** Influencia de la catalase y de la  $\beta$ -Toxina en la patogénesis de *Staphylococcus aureus*. Memoria para optar al Título de Doctora. Madrid: Universidad Complutense de Madrid. 114p.
47. **May ER. 2006.** Bacterial skin diseases: current thoughts on pathogenesis and management. *Vet Clin North Am Small Pract* 36(1): 185-202.
48. **Méndez S, Pérez E. 2004.** La PCR múltiple en microbiología clínica. *Enfermedades infecciosas y Microbiología Clínica*. 22(3):183-192
49. **Mccormick JK, Yarwood JM, Schlievert PM. 2001.** Toxic shock syndrome and bacterial superantigens: an update. *Ann Rev Microbiol* 55: 77-104.
50. **Monzant G, Chávez V, Carrero L. 2019.** Susceptibilidad antimicrobiana de estafilococos aislados en piodermas de caninos de Coro, Venezuela. *Rev Inv Vet Perú* 2019; 30(1): 404-422
51. **Mülhardt C. 2007.** *Molecular Biology and Genomics*. 1ed. California: Elsevier. 272p.



52. **Onuma K, Tanabe T, Sato H. 2011.** Antimicrobial resistance of *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from healthy dogs and dogs affected with pioderma in Japan. *Vet. Dermatol.* 23(1): 17-22.
53. **Ortega E, Abriouel H, Lucas R, Gálvez A. 2010.** Multiple roles of *Staphylococcus aureus* enterotoxins: Pathogenecity, superantigenic activity, and correlation to antibiotic resistance. *Toxins* 2: 2117-2131.
54. **Pitchenin L, Santos L, Assunção J, Kagueyama F, Silva A, Magalhaes I, Nakazato L, Dutra V. 2017.** Occurrence of toxin genes in *Staphylococcus pseudintermedius* from diseased dogs and other domestic and wild species. *J Infect Dev Ctries* 11(12):957-961
55. **Pulgarín S. 2005.** Influencia de la catalasa y de la  $\beta$ -toxina en la patogénesis de *Staphylococcus aureus*. Memoria para optar el grado de Doctor. Madrid: Universidad complutense de Madrid 114p.
56. **Quinn PJ, Markey BK, Carter ME, Donnelly WJ, Leonard FC. 1994.** Microbiología y enfermedades infecciosas veterinarias. Zaragoza: Acribia. 667 p.
57. **Ralf S. 2008.** Infecciones cutáneas en perros. *Argos Boletín Informativo* 101 (1): 50-54.
58. **Russell N. 2014.** ANALISIS DE LAS INDICACIONES TERAPEÚTICAS PARA EL PIODERMA CANINO POR *Staphylococcus pseudintermedius*. Proyecto de memoria para optar al Título Profesional de Médico Veterinario. Santiago: Universidad de Chile 24 p.
59. **Rocha R, Lozano P, Martínez Y. 2004.** Mecanismos de Patogenicidad e Interacción parasito-hospedero. 1ª Ed. México: Fomento Editorial. 287p.
60. **Romero MF. 2014.** Determinación preliminar de los patrones de resistencia antimicrobiana de las bacterias pertenecientes al género *Staphylococcus* spp. causantes de pioderma en pacientes caninos atendidos en clínicas veterinarias del Área Metropolitana. Tesis de Médico Veterinario. Univ. Nac. De Costa Rica. 64p.
61. **Rubin JE, Chirino-Trejo M. 2011.** Prevalence, sites of colonization, and antimicrobial resistance among *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from healthy dogs in Saskatoon, Canada. *J Vet Diagn Invest*;23: 351-354.

62. **Ruzauskas M, Couto N, Pavilonis A, Klimiene I, Siugzdiniene R, Virgailis M, Vaskeviciute L, Anskiene L, Pomba C. 2016.** Characterization of *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from diseased dogs in Lithuania. Lithuania. Polish Journal of Veterinary Sciences Vol. 19, No. (1): 7–14
63. **Salazar AM, Sandoval AS, Armendariz JS. 2013.** Biología Molecular: Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud. 1era Ed. México DF: McGraw-Hill. 338p.
64. **Sánchez R, Calle S, Falcón N, Pinto C. 2011.** Bacterial isolation in canine ear infections and its antimicrobial susceptibility. Rev Inv Vet Perú, 22(2): 161-166.
65. **Sareyyüpoğlu B, Müştak H, Cantekin Z, Diker K. 2013.** Molecular detection of exfoliative toxin in *Staphylococcus intermedius* isolates from dogs with pododermatitis. Turkey. Ankara Üniv Vet Fak Derg, 60, 15-19.
66. **Sasaki T, Kikuchi, Tanaka Y, Takahashi N, Kamata S, Hiramatsu K. 2007.** Reclassification of phenotypically identified *Staphylococcus intermedius* strains. J. Clin. Microbiol. 45(9): 2270-2278.
67. **Senturk S, Özel E, Sen A. 2005.** Clinical efficacy of rifampicin for treatment of canine pododermatitis. Acta Vet. BRNO. 74:117-122.
68. **Soler M, Tello M, Moreso JM, Riera L. 2000.** Otitis externa en perros y gatos: aislamiento microbiológico y antibioterapia. Clínica veterinaria de pequeños animales. Avepe vol. 20: 72-75.
69. **Thomas D, Chou S, Dauwalder O, Lina G. 2007.** Diversity in *Staphylococcus aureus* enterotoxins. Chem Immunol Allergy 93: 24-41.
70. **Tulcán C. 2018.** Determinación de la presencia de *Staphylococcus* spp. coagulasa positivo y sus patrones de resistencia a antibióticos en casos de pododermatitis canina en la clínica veterinaria FMVZ-UCE. Informe final para optar el Título de Médico Veterinario Zootecnista. Quito: Universidad Central del Ecuador. 48p.

71. **Vigo G, Giacoboni G, Galletti P, Pasterán F, Corso A. 2015.** Resistencia antimicrobiana y epidemiología molecular de aislamientos de *Staphylococcus pseudintermedius* de muestras clínicas de caninos. Rev Argent Microbiol 47 (3): 206-211.
72. **Wang Y, Yang J, Logue CM, Liu K, Cao X, Zhang W, Shen J, Wu C. 2012.** Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from canine pyoderma in North China. Journal of Applied Microbiology 112(4): 623-630.
73. **Youn JH, Koo HC, Ahn KJ, Lim SK, Park YH .2011.** Determination of staphylococcal exotoxins, SCCmec types, and genetic relatedness of *Staphylococcus intermedius* group isolates from veterinary staff, companion animals, and hospital environments in Korea. J Vet Sci 12: 221-226.

## ANEXO 1

### Reactivación y extracción de ADN

#### I. Procedimiento

##### *ETAPA I: Reactivación de cepas*

1. Utilizar un tubo con LB o TSB (2ml) e incubar a temperatura ambiente.
2. Dispersar con un tip estéril o con un asa de caldo (una gota) en el tubo con TSB e incubar a 37°C por 3 horas como mínimo, esperando la turbidez del medio
3. Sembrar en TSA e incubar a 37°C por 24 horas
4. Colocar 1500 µl de caldo TSA en viales de 2ml. Llevar los frascos de TSB y viales a la cámara de flujo.
5. Inocular la cepa e incubar a 37°C por 3 horas.

##### *ETAPA II: Preparación del Buffer de Lisis*

1. Preparar EDTA al 0.5 M y Tris-Cl a 1M  
Nota: El EDTA solo se solubiliza pH 8.0
2. Para preparar 20 ml de buffer se agrega lo siguiente
  - 2.1. 0.4ml de 1M de Tris-Cl (Concentración final de 20mM Tris-Cl en el buffer)
  - 2.2. 0.08ml de 0.5M EDTA (Concentración final de 2mM EDTA)
  - 2.3. 0.24ml de Triton X-100 (Concentración final de 1.2% Triton X-100 en el buffer)y completar con agua destilada
3. La lisozima se debe agregar inmediatamente antes de usar a una alícuota del buffer, según la cantidad de muestras a extraer

##### *ETAPA III: Purificación de ADN genómico de bacterias Gram positivas*

1. Recolectar  $2 \times 10^9$  células bacterianas en un tubo de microcentrífuga de 1.5-2ml por centrifugación por 10 minutos a 5 000 X gravedades y descartar el sobrenadante.
  2. Resuspender el pellet en 180 µl de Buffer de lisis preparado. Incubar a 37°C por 30 minutos.
  3. Añadir 200 µl de Solución de Lisis y 20 µl de Proteinasa K a la muestra. Mezclar bien utilizando el Vortex hasta que se obtenga una mezcla homogénea.
  4. Incubar la muestra a 56°C mientras ocasionalmente se coloca en el Vortex o usar una plataforma oscilante o termomezclador hasta que las células se encuentren totalmente lisadas (30 minutos aproximadamente)
  5. Añadir 20 µl de Solución de RNasa A, mezclar utilizando el Vortex e incubar la mezcla por 10 minutos a temperatura ambiente.
  6. Añadir 400 µl de etanol al 50% y mezclar pipeteando o usando el Vortex.
  7. Transferir el lisado a una columna del kit insertada en un tubo colector. Centrifugar la columna por 1 minuto a 6000 X gravedades. Descartar el tubo colector que contiene el filtrado. Coloque la columna en un nuevo tubo colector de 2ml (incluido)
  8. Añadir 500 µl de Wash Buffer I (con etanol añadido). Centrifugar por 1 minuto a 8000 X gravedades. Descartar el filtrado y colocar la columna de purificación de regreso en el tubo colector.
  9. Añadir 500 µl de Wash Buffer II (con etanol añadido) a la columna. Centrifugar por 3 minutos a velocidad máxima ( $\geq 1200$  X gravedades). Descarte el tubo colector que contiene el filtrado y transferir la columna a un tubo de Microcentrífuga estéril de 1.5 ml (no incluido).
- Opcional: Si se observa una solución residual en la columna de purificación, vacíe el tubo colector y centrifugue nuevamente por 1 minuto a máxima velocidad.

10. Añadir 100 µl de Buffer de Elución al centro de la membrana de la columna para eluir el DNA genómico. Incubar por 2 minutos a temperatura ambiente y centrifugar por 1 minuto a 8 000X gravedades.

Nota:

10.1. Para un máximo rendimiento de DNA, repetir la elución con 100 µl de Buffer de Elución adicionales

10.2. Si se requiere una mayor concentración de DNA o si el DNA es aislado de una pequeña cantidad de material inicial, el volumen del Buffer de Elución añadido a la columna puede ser reducido a 50-100 µl. Tener en consideración que pequeños volúmenes de Buffer de Elución resultará en pequeñas cantidades finales de DNA eluido.

11. Descartar la columna de purificación. Usar el DNA purificado inmediatamente o almacenar a -20°C.

## ANEXO 2

Resultados de la Detección de genes de virulencia asociados a toxinas mediante PCR-Múltiple  
de los aislados de piodermas del año 2016

NÚMERO DE ORDEN	CÓDIGO	ESPECIE	GENES DE VIRULENCIA			
			<i>siet</i>	<i>lukS</i>	<i>lukF</i>	<i>tst</i>
1	G + 41	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
2	G + 42	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
3	G + 43	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
4	G + 44	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
5	G + 45	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
6	G + 46	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
7	G + 47	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
8	G + 49	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
9	G + 50	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
10	G + 52	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
11	G + 56	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
12	G + 57	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
13	G + 59	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
14	G + 62	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
15	G + 64	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
16	G + 65	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
17	G + 66	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
18	G + 68	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
19	G + 69	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
20	G + 73	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
21	G + 75 II	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
22	G + 77	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
23	G + 78	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
24	G + 79	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
25	G + 80	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
26	G + 84	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
27	G + 85	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
28	G + 93	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
29	G + 94	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
30	G + 95	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
31	G + 96	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
32	G + 97	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
33	G + 98	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
34	G + 99	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
35	G + 106	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
36	G + 107	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
37	G + 108	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
38	G + 110	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
39	G + 114	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
40	G + 115	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
41	G + 116	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-

+: Positivo      -: Negativo

### ANEXO 3

Resultados de la Detección de genes de virulencia asociados a toxinas mediante PCR-Múltiple  
de los aislados de piodermas del año 2017

NÚMERO DE ORDEN	CÓDIGO	ESPECIE	GENES DE VIRULENCIA			
			<i>siet</i>	<i>lukS</i>	<i>lukF</i>	<i>tst</i>
1	RM1	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
2	RM2	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
3	RM3	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
4	RM4	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
5	RM6	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
6	S8	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
7	S9	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
8	S10	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
9	S13	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
10	S15	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
11	S17	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
12	S18	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
13	S19	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
14	S21	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
15	S23	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
16	S24	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
17	S28	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
18	S29	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
19	S30	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
20	S31	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
21	S32	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
22	S33	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
23	S34	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
24	S36	<i>S. pseudintermedius</i>	+	-	-	-
25	S37	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
26	S38	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
27	S39	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
28	S40	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
29	S41	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
30	S42	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
31	S43	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
32	S44	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
33	S45	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
34	S46	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
35	S47	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
36	S48	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
37	S49	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
38	S50	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
39	S51	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
40	S53	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
41	S54	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
42	S55	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
43	S57	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
44	S58	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
45	S60	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
46	S61	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
47	S63	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-

+: Positivo      -: Negativo



## ANEXO 4

Resultados de la Detección de genes de virulencia asociados a toxinas mediante PCR-Múltiple  
de los aislados de piodermas del año 2018

NÚMERO DE ORDEN	CÓDIGO	ESPECIE	GENES DE VIRULENCIA			
			<i>siet</i>	<i>lukS</i>	<i>lukF</i>	<i>tst</i>
1	ST-2	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
2	ST-3	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
3	ST-4	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
4	ST-5	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
5	ST-6	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
6	ST-8	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
7	ST-9	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
8	ST-10	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
9	ST-11	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
10	ST-14	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
11	ST-15	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
12	ST-16	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
13	ST-15(1)	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
14	ST-16(1)	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
15	ST-17	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
16	ST-20	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
17	ST-21	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
18	ST-22	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
19	ST-23	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
20	ST-24	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
21	ST-25	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
22	ST-26	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
23	ST-27	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
24	ST-28	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
25	ST-29	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
26	ST-30	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
27	ST-31	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
28	ST-32	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
29	ST-33	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
30	ST-34	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
31	ST-37	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
32	ST-38	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
33	ST-40	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
34	ST-41	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
35	ST-42	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
36	ST-44	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-

+ : Positivo      - : Negativo

## ANEXO 5






Resultados de la Detección de genes de virulencia asociados a toxinas mediante PCR-Múltiple  
de los aislados de otitis externas del año 2018




NÚMERO DE ORDEN	CÓDIGO	ESPECIE	GENES DE VIRULENCIA			
			<i>siet</i>	<i>lukS</i>	<i>lukF</i>	<i>tst</i>
1	S047	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
2	S048	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
3	S050	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
4	S051	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
5	S052	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
6	S075	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
7	S082	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
8	S092	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
9	S096	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
10	S003	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
11	S004	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
12	S005	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
13	S006	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
14	S007	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
15	S008	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-
16	S010	<i>S. pseudintermedius</i>	-	-	+	-
17	S013	<i>S. pseudintermedius</i>	+	+	+	-

+: Positivo      -: Negativo

## ANEXO 6

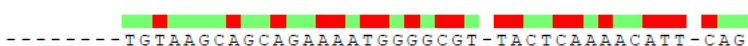
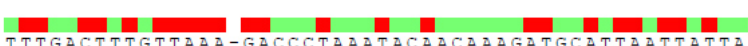




Alineamiento del producto amplificado del gen *siet* de la cepa ST8 con las cepas de *S. pseudintermedius* HKU10-03 (CP002439.1) y de *S. intermedius* (BN000819.1)


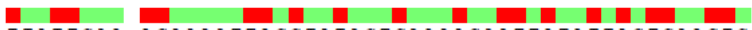

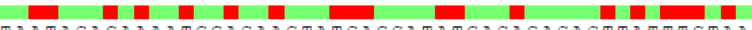

	
	ATGGAAAATTTAGCGGCATCTGGAGGCTACTACATTTTCAG 40
	10 20 30 40
Consenso Siet.seq	ATGGAAAATTTAGCGGCATCTGGAGGCTACTACATTTTCAG 40
S. pseud HKU10-03	ATGGAAAATTTAGCGGCATCTGGAGGCTACTACATTTTCAG 40
S. intermed BN000819.1	ATGGAAAATTTAGCGGCATCTGGAGGCTACTACATTTTCAG 40
S. cohnii ATCC 29974	-----GCTGCATCTGGTGGATATTATATTTTCAG 28
	
	CACCAGCCGATAAAAATTTATGCGGGTCCTCAATCTTTAAC 80
	50 60 70 80
Consenso Siet.seq	CACCAGCCGATAAAAATTTATGCGGGTCCTCAATCTTTAAC 80
S. pseud HKU10-03	CACCAGCCGATAAAAATTTATGCGGGTCCTCAATCTTTAAC 80
S. intermed BN000819.1	CACCAGCCGATAAAAATTTATGCGGGTCCTCAATCTTTAAC 80
S. cohnii ATCC 29974	CCCCTGCCGATAAAAATATATGCTGGCCCTCAATCTACTAC 68
	
	AGGTTCAATTGGTGTCAATTTCTGAGTCAAAAGATTATTCA 120
	90 100 110 120
Consenso Siet.seq	AGGTTCAATTGGTGTCAATTTCTGAGTCAAAAGATTATTCA 120
S. pseud HKU10-03	AGGTTCAATTGGTGTCAATTTCTGAGTCAAAAGATTATTCA 120
S. intermed BN000819.1	AGGTTCAATTGGTGTCAATTTCTGAGTCAAAAGATTATTCA 120
S. cohnii ATCC 29974	TGGGTCCATTGGCGTTATTATGTCAAATGTTGATTATTCT 108
	
	GAGCTTTTGGACAACCTTAGGCATTAAAAACAAACACAATCA 160
	130 140 150 160
Consenso Siet.seq	GAGCTTTTGGACAACCTTAGGCATTAAAAACAAACACAATCA 160
S. pseud HKU10-03	GAGCTTTTGGACAACCTTAGGCATTAAAAACAAACACAATCA 160
S. intermed BN000819.1	GAGCTTTTGGACAACCTTAGGCATTAAAAACAAACACAATCA 160
S. cohnii ATCC 29974	GGATTACAAGAAAACTAGGCATTAAAGGAAAATGTCATTA 148
	
	AATCAGGTGCACATAAAGATATTTTAAGTAGTTCTCGTAA 200
	170 180 190 200
Consenso Siet.seq	AATCAGGTGCACATAAAGATATTTTAAGTAGTTCTCGTAA 200
S. pseud HKU10-03	AATCAGGTGCACATAAAGATATTTTAAGTAGTTCTCGTAA 200
S. intermed BN000819.1	AATCAGGTGCACATAAAGATATTTTAAGTAGTTCTCGTAA 200
S. cohnii ATCC 29974	AATCAGGTGAGCATAAAGACATTATGAGTAGCTCTCGAGA 188
	
	AATGACAGATGAAGAAAGAGAGATTTTACAGTCTATTAAT 240
	210 220 230 240
Consenso Siet.seq	AATGACAGATGAAGAAAGAGAGATTTTACAGTCTATTAAT 240
S. pseud HKU10-03	AATGACAGATGAAGAAAGAGAGATTTTACAGTCTATTAAT 240
S. intermed BN000819.1	AATGACAGATGAAGAAAGAGAGATTTTACAGTCTATTAAT 240
S. cohnii ATCC 29974	AATGACTAATGAGGAAAAAGATATCCTGCAATCTGTATTA 228

		
	AAAGATAGTTTTGATCAATTTGTCAATGTGGTTAAAGAGG	
	250 260 270 280	
Consenso Siet.seq	AAAGATAGTTTTGATCAATTTGTCAATGTGGTTAAAGAGG	280
S. pseudu HKU10-03	AAAGATAGTTTTGATCAATTTGTCAATGTGGTTAAAGAGG	280
S. intermed BN000819.1	AAAGATAGTTTTGATCAATTTGTCAATGTGGTTAAAGAGG	280
S. cohnii ATCC 29974	GATGATAGTTATCAAAGATTTATTAATATTGTTGCAGAAG	268
		
	GACGTCAAATGTCCGAATCAAAAGTGCGTGAATTGGCAGA	
	290 300 310 320	
Consenso Siet.seq	GACGTCAAATGTCCGAATCAAAAGTGCGTGAATTGGCAGA	320
S. pseudu HKU10-03	GACGTCAAATGTCCGAATCAAAAGTGCGTGAATTGGCAGA	320
S. intermed BN000819.1	GACGTCAAATGTCCGAATCAAAAGTGCGTGAATTGGCAGA	320
S. cohnii ATCC 29974	GTAGAGATATGCCAGAGAAAAAGGTTGAAAAGTTAGCTGA	308
		
	TGGACGTATTTATAGTGCACAACAAGC-GAAAAGTAATGG	
	330 340 350 360	
Consenso Siet.seq	TGGACGTATTTATAGTGCACAACAAGC-GAAAAGTAATGG	359
S. pseudu HKU10-03	TGGACGTATTTATAGTGCACAACAAGC-GAAAAGTAATGG	359
S. intermed BN000819.1	TGGACGTATTTATAGTGCACAACAAGC-GAAAAGTAATGG	359
S. cohnii ATCC 29974	TGGACGTATTTATAGTGCACAACAAGCTGAAAAAG	342

## ANEXO 7







Alineamiento del producto amplificado del gen *lukS* de la cepa ST8 con la cepa de *S. pseudintermedius* HKU 10-03 (CP002439.1) y con *S. intermedius* (X79188.1)

		
	-----TGTAAGCAGCAGAAAAATGGGGCGT-TACTCAAAACATT-CAG	
	10 20 30 40 50	
Consenso LukS.seq	-----TGTAAGCAGCAGAAAAATGGGGCGT-TACTCAAAACATT-CAG	40
<i>S. pseud</i> HKU10-03	-----TGTAAGCAGCAGAAAAATGGGGCGT-TACTCAAAACATT-CAG	40
<i>S. intermed</i> lukS	-----TGTAAGCAGCAGAAAAATGGGGCGT-TACTCAAAACATT-CAG	40
<i>S. delphini</i> LR134263.1	CCAATAGGACTTCTTACAAATAAGTGTGTGCGCATATGCAGATAATTGCC	50
		
	TTTGACTTTGTTAAA-GACCCTAAATACAACAAAGATGCATTAATTATTA	
	60 70 80 90 100	
Consenso LukS.seq	TTTGACTTTGTTAAA-GACCCTAAATACAACAAAGATGCATTAATTATTA	89
<i>S. pseud</i> HKU10-03	TTTGACTTTGTTAAA-GACCCTAAATACAACAAAGATGCATTAATTATTA	89
<i>S. intermed</i> lukS	TTTGACTTTGTTAAA-GACCCTAAATACAACAAAGATGCATTAATTATTA	89
<i>S. delphini</i> LR134263.1	ATTTTCTGTATTAAATGAATTTGCCTTAACCTCCCATTTAATATTTTGG	100
		
	AAATGCAAGGTTTTATCAAATCTAGAACAAGTTTTACTGATGTTAAAGGG	
	110 120 130 140 150	
Consenso LukS.seq	AAATGCAAGGTTTTATCAAATCTAGAACAAGTTTTACTGATGTTAAAGGG	139
<i>S. pseud</i> HKU10-03	AAATGCAAGGTTTTATCAAATCTAGAACAAGTTTTACTGATGTTAAAGGG	139
<i>S. intermed</i> lukS	AAATGCAAGGTTTTATCAAATCTAGAACAAGTTTTACTGATGTTAAAGGG	139
<i>S. delphini</i> LR134263.1	AGTTTTGCTGAGCGACTTCACTCACA--TAGTTTTGTTG--GTTATAGCT	146
		
	AAAGGATATGAATCAACAAAAAGAATGCTTTGGCCCTTTTCAATATAATAT	
	160 170 180 190 200	
Consenso LukS.seq	AAAGGATATGAATCAACAAAAAGAATGCTTTGGCCCTTTTCAATATAATAT	189
<i>S. pseud</i> HKU10-03	AAAGGATATGAATCAACAAAAAGAATGCTTTGGCCCTTTTCAATATAATAT	189
<i>S. intermed</i> lukS	AAAGGATATGAATCAACAAAAAGAATCCTTTGGCCCTTTTCAATATAATAT	189
<i>S. delphini</i> LR134263.1	GATTTTCTTTAAATAATTAAATGCACCTTTACCCTAATTGATGGTGAAT	196
		
	TGCTCTAAAAACAAATGATCCTAATGTCTTTTAAATTAATTATCTCCCTA	
	210 220 230 240 250	
Consenso LukS.seq	TGCTCTAAAAACAAATGATCCTAATGTCTTTTAAATTAATTATCTCCCTA	239
<i>S. pseud</i> HKU10-03	TGCTCTAAAAACAAATGATCCTAATGTCTTTTAAATTAATTATCTCCCTA	239
<i>S. intermed</i> lukS	TGCTCTAAAAACAAATGATCCTAATGTCTTTTAAATTAATTATCTCCCTA	239
<i>S. delphini</i> LR134263.1	TATTGAAATTACCACCAATGTTA-TAGCCTAGTGTTTGACTGACATC-TA	244
		
	AAAATAAAATTGAATCAATAGATGTGAGCCAAACATTAGGTTACAATGTT	
	260 270 280 290 300	
Consenso LukS.seq	AAAATAAAATTGAATCAATAGATGTGAGCCAAACATTAGGTTACAATGTT	289
<i>S. pseud</i> HKU10-03	AAAATAAAATTGAATCAATAGATGTGAGCCAAACATTAGGTTACAATGTT	289
<i>S. intermed</i> lukS	AAAATAAAATTGAATCAATAGATGTGAGCCAAACATTAGGTTACAATGTT	289
<i>S. delphini</i> LR134263.1	CTGATTCAATTTTATTTTATAGGCAGATAATTAAT-TAAAGCAACATTTGG	293

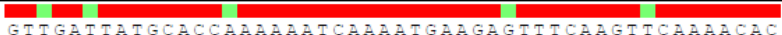
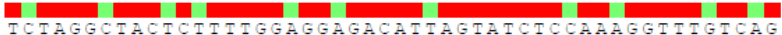
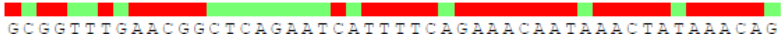

		
	GGCGGTAAC TTCCAAAGTGCACCATTACTTGGGGGTAAAGGCGCATTTAA	
	310 320 330 340 350	
Consenso LukS.seq	GGCGGTAAC TTCCAAAGTGCACCATTACTTGGGGGTAAAGGCGCATTTAA	339
S. pseud HKU10-03	GGCGGTAAC TTCCAAAGTGCACCATTACTTGGGGGTAAAGGCGCATTTAA	339
S.intermed lukS	GGCGGTAAC TTCCAAAGTGCACCATTACTTGGGGGTAAAGGCGAATTTAA	339
S. delphini LR134263.1	ATCGTTTGT TTTTAAAG--CAATGTTATATTGG---AAAGGCCAAATCAT	338
		
	TTATTCAA-AGAAAATTAGCTATACTCAAAAGAATTATATTAGTGAAGTC	
	360 370 380 390 400	
Consenso LukS.seq	TTATTCAA-AGAAAATTAGCTATACTCAAAAGAATTATATTAGTGAAGTC	388
S. pseud HKU10-03	TTATTCAA-AGAAAATTAGCTATACTCAAAAGAATTATATTAGTGAAGTC	388
S.intermed lukS	TTATTCAA-AGAAAATTAGCTATACTCAAAAGAATTATATTAGTGAAGTC	388
S. delphini LR134263.1	TCGTTTTGTAGCTTCATATCCTTTTCCTTTAACATCA-GTAAATGCTGTT	387
		
	GCACAACAAAATTCAAAAAATATCAGATGGGAAGTCAAAGCAAATTCATT	
	410 420 430 440 450	
Consenso LukS.seq	GCACAACAAAATTCAAAAAATATCAGATGGGAAGTCAAAGCAAATTCATT	438
S. pseud HKU10-03	GCACAACAAAATTCAAAAAATATCAGATGGGAAGTCAAAGCAAATTCATT	438
S.intermed lukS	GCACAACAAAATTCAAAAAATATCAGATGGGAAGTCAAAGCAAATTCATT	438
S. delphini LR134263.1	-CTCGATTGAAT--AAATCCTTGCATTTTAATAATTAATGCATCTTTGTT	434
		
	TAATACAGAAAATGGACAAGTATCAGCATATGACAGACACTTATTTGTAA	
	460 470 480 490 500	
Consenso LukS.seq	TAATACAGAAAATGGACAAGTATCAGCATATGACAGACACTTATTTGTAA	488
S. pseud HKU10-03	TAATACAGAAAATGGACAAGTATCAGCATATGACAGACACTTATTTGTAA	488
S.intermed lukS	TAATACAGAAAATGGACAAGTATCAGCATATGACAGACACTTATTTGTAA	488
S. delphini LR134263.1	ATATTTTGGATCTTTAACAAAGTCAA---ATTGAATGTTTGGAGTTGCAC	481
		
	GAAGTCCTATCGGGC	
	510	
Consenso LukS.seq	GAAGTCCTATCGGGC	503
S. pseud HKU10-03	GAAGTCCTATCGGGC	503
S.intermed lukS	GAAGTCCTATCGGGC	503
S. delphini LR134263.1	CCCATTTTCT	491

## ANEXO 8

Alineamiento del producto amplificado del gen *lukF* de la cepa ST8 con la cepa de *S. pseudintermedius* strain 063228 (CP015626.1) y con *S. intermedius* (X79188.1)

	
	CCTGTCATATGCCGCTAATCAAATTACACCTGTATCTGAAAAAAGGTAGA 50
Consenso LukF.seq	CCTGTCATATGCCGCTAATCAAATTACACCTGTATCTGAAAAAAGGTAGA 50
<i>S. pseud</i> i CP015626.1.seq	CCTGTCATATGCCGCTAATCAAATTACACCTGTATCTGAAAAAAGGTAGA 50
<i>S. intermed</i> X79188.1.seq	CCTGTCATATGCCGCTAATCAAATTACACCTGTATCTGAAAAAAGGTAGA 50
<i>S. aureus</i> CP022291.1.seq	-----AAAAAAGGTAGA 11
	
	CGATAAAATCACTTTATATAAGACTACCGCTACTGCAGATTTCAGATAAGT 100
Consenso LukF.seq	CGATAAAATCACTTTATATAAGACTACCGCTACTGCAGATTTCAGATAAGT 100
<i>S. pseud</i> i CP015626.1.seq	CGATAAAATCACTTTATATAAGACTACCGCTACTGCAGATTTCAGATAAGT 100
<i>S. intermed</i> X79188.1.seq	CGATAAAATCACTTTATATAAGACTACCGCTACTGCAGATTTCAGATAAGT 100
<i>S. aureus</i> CP022291.1.seq	TGATAAAGTTACTTTATACAAAACCTACAGCTACAGCAGATTTCAGATAAAT 61
	
	TAAATATTTCTCAACTCTTAACCTTTTAATTTTATTAAGGATAAGAGCTAT 150
Consenso LukF.seq	TAAATATTTCTCAACTCTTAACCTTTTAATTTTATTAAGGATAAGAGCTAT 150
<i>S. pseud</i> i CP015626.1.seq	TAAATATTTCTCAACTCTTAACCTTTTAATTTTATTAAGGATAAGAGCTAT 150
<i>S. intermed</i> X79188.1.seq	TAAATATTTCTCAACTCTTAACCTTTTAATTTTATTAAGGATAAGAGCTAT 150
<i>S. aureus</i> CP022291.1.seq	TCAAAATTTTCACAGATTTTAAACATTTAATTTTCATCAAAGATAAAAGTTAT 111
	
	GATAAGGATACCTTAGTACTTTAAAGCTGCAGGTAATATTAACCTCAGGTTA 200
Consenso LukF.seq	GATAAGGATACCTTAGTACTTTAAAGCTGCAGGTAATATTAACCTCAGGTTA 200
<i>S. pseud</i> i CP015626.1.seq	GATAAGGATACCTTAGTACTTTAAAGCTGCAGGTAATATTAACCTCAGGTTA 200
<i>S. intermed</i> X79188.1.seq	GATAAGGATACCTTAGTACTTTAAAGCTGCAGGTAATATTAACCTCAGGTTA 200
<i>S. aureus</i> CP022291.1.seq	GATAAAGATACTTTTAGTACTTTAAAGCTGCAGGTAATATTAACCTCAGGTTA 161
	
	TAAAAGCCCTAACCCTAACGACTATATCTATTCAAGTTTTTATTGGGGGG 250
Consenso LukF.seq	TAAAAGCCCTAACCCTAACGACTATATCTATTCAAGTTTTTATTGGGGGG 250
<i>S. pseud</i> i CP015626.1.seq	TAAAAGCCCTAACCCTAACGACTATATCTATTCAAGTTTTTATTGGGGGG 250
<i>S. intermed</i> X79188.1.seq	TAAAAGCCCTAACCCTAACGACTATATCTATTCAAGTTTTTATTGGGGGG 250
<i>S. aureus</i> CP022291.1.seq	TGAAAGACCAAAACCCTAAAGACTATGACTTTTCAAAAATATATTGGGGGTG 211
	
	CTAAGTATAATGTGTCAATCAGTGCAGAATCAAAAGGTGCTGTTAACGTA 300
Consenso LukF.seq	CTAAGTATAATGTGTCAATCAGTGCAGAATCAAAAGGTGCTGTTAACGTA 300
<i>S. pseud</i> i CP015626.1.seq	CTAAGTATAATGTGTCAATCAGTGCAGAATCAAAAGGTGCTGTTAACGTA 300
<i>S. intermed</i> X79188.1.seq	CTAAGTATAATGTGTCAATCAGTGCAGAATCAAAAGGTGCTGTTAACGTA 300
<i>S. aureus</i> CP022291.1.seq	CAAAATACAATGTGTCTATCAGTTCACAATCTAATGATTGGGTAAATGTA 261



		
	GTGATTATGCACCAAAAAATCAAAATGAAGAGTTTCAAGTTCAAAACAC	
	310 320 330 340 350	
Consenso LukF.seq	GTGATTATGCACCAAAAAATCAAAATGAAGAGTTTCAAGTTCAAAACAC	350
S. pseudī CP015626.1.seq	GTGATTATGCACCAAAAAATCAAAATGAAGAGTTTCAAGTTCAAAACAC	350
S. intermed X79188.1.seq	GTGATTATGCACCAAAAAATCAAAATGAAGAGTTTCAAGTTCAAAACAC	350
S. aureus CP022291.1.seq	GTAGACTATGCACCTAAAAATCAAAATGAAGAATTTCAAGTGCAAAACAC	311
		
	TCTAGGCTACTCTTTTGGAGGAGACATTAGTATCTCCAAAGGTTTGTCTAG	
	360 370 380 390 400	
Consenso LukF.seq	TCTAGGCTACTCTTTTGGAGGAGACATTAGTATCTCCAAAGGTTTGTCTAG	400
S. pseudī CP015626.1.seq	TCTAGGCTACTCTTTTGGAGGAGACATTAGTATCTCCAAAGGTTTGTCTAG	400
S. intermed X79188.1.seq	TCTAGGCTACTCTTTTGGAGGAGACATTAGTATCTCCAAAGGTTTGTCTAG	400
S. aureus CP022291.1.seq	TTTAGGATACACATTTGGTGGTGACATCAGTATCTCTAATGGTTTATCTG	361
		
	GCGGTTTGAACGGCTCAGAATCATTTTCAGAAACAATAAACTATAAACAG	
	410 420 430 440 450	
Consenso LukF.seq	GCGGTTTGAACGGCTCAGAATCATTTTCAGAAACAATAAACTATAAACAG	450
S. pseudī CP015626.1.seq	GCGGTTTGAACGGCTCAGAATCATTTTCAGAAACAATAAACTATAAACAG	450
S. intermed X79188.1.seq	GCGGTTTGAACGGCTCAGAATCATTTTCAGAAACAATAAACTATAAACAG	450
S. aureus CP022291.1.seq	GTGGACTTAACGGAAACACTGCTTTTTCTGAAACAATTAACACAAACAA	411
		
	GAAAGTTATAGAACAACCTATCGATAAAACACACAGATAATAAAACTATTGG	
	460 470 480 490 500	
Consenso LukF.seq	GAAAGTTATAGAACAACCTATCGATAAAACACACAGATAATAAAACTATTGG	500
S. pseudī CP015626.1.seq	GAAAGTTATAGAACAACCTATCGATAAAACACACAGATAATAAAACTATTGG	500
S. intermed X79188.1.seq	GAAAGTTATAGAACAACCTATCGATAAAACACACAGATAATAAAACTATTGG	500
S. aureus CP022291.1.seq	GAAAGTTACAGAACAACCTTTAAGTCGCAACACAAATTATAAAAAATGTCGG	461
		
	CTGGGGCGTTGAAGCACATAAAATCATGAATGCTGGTTGGGGGCCCATATG	
	510 520 530 540 550	
Consenso LukF.seq	CTGGGGCGTTGAAGCACATAAAATCATGAATGCTGGTTGGGGGCCCATATG	550
S. pseudī CP015626.1.seq	CTGGGGCGTTGAAGCACATAAAATCATGAATGCTGGTTGGGGGCCCATATG	550
S. intermed X79188.1.seq	CTGGGGCGTTGAAGCACATAAAATCATGAATGCTGGTTGGGGGCCCATATG	550
S. aureus CP022291.1.seq	TTGGGGGTGTAGAAGCACATAAAATTATGAATAATGGTTGGGGGCCCATATG	511
		
	GTCGAGATAGCTTCCATGACCT	
	560 570	
Consenso LukF.seq	GTCGAGATAGCTTCCATGACCT	572
S. pseudī CP015626.1.seq	GTCGAGATAGCTTCCATGACCT	572
S. intermed X79188.1.seq	GTCGAGATAGCTTCCATGACCT	572
S. aureus CP022291.1.seq	GCCGAGATAGCTTCCAT	528





**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS EN MODALIDAD VIRTUAL  
PARA OPTAR EL TÍTULO DE MEDICO VETERINARIO  
Autorizado por R.D N° 304-D-FMV-2020**

**1. FECHA DE LA SUSTENTACIÓN 26/08/2020**

HORA INICIO: 11:30

HORA TÉRMINO: 12.45

**2. MIEMBROS DEL JURADO**

PRESIDENTE: Blgo. Mg. Sonia Yenny Calle Espinoza

MIEMBRO: MV. Esp. Diego Díaz Coahila

MIEMBRO: MV. Ysaac Rubén Chipayo Gonzáles

ASESOR MV. Mg. Juan José, Siuce Moreno

**3. DATOS DEL TESISISTA**

APELLIDOS Y NOMBRES: RIVAS ROSALES, NÉSTOR LEE BRAYAN

CÓDIGO: 14080038

R.R. DE GRADO DE TESISISTA NÚMERO: N° 013736-2020-R/UNMSM

TÍTULO DE LA TESIS: "DETECCIÓN DE GENES DE VIRULENCIA ASOCIADOS A TOXINAS EN AISLADOS DE *Staphylococcus pseudintermedius* DE PIODERMAS Y OTITIS CANINAS"

**4. RECOMENDACIONES**

---

Datos de la plataforma virtual institucional del acto de sustentación:

<https://meet.google.com/qjf-tnio-oyh>, [meet.google.com/fhn-yhfh-msk](https://meet.google.com/fhn-yhfh-msk)

ID:


Grabación archivada en: MEET GOOGLE

**5. NOTA OBTENIDA: 18 (en números), dieciocho (en letras)**

**6. PÚBLICO ASISTENTE: (Nombre, apellido y DNI)**

Apellidos y Nombres	DNI	Correo electrónico
Alvarez Vega, Luis	71419745	alvarezvega.luisguillermo@gmail.com
Palomino Farfán, Joel	46238101	mv.joel9607@gmail.com
Gonzales Magallanes, Sofia	75200383	sofia.gonzales1@unmsm.edu.pe
Cruz Calixto, Emelin	76287759	emelinvet5@gmail.com
Cayo Rodríguez, Samantha	74078280	samantha.cayo@unmsm.edu.pe
Muñoz Huamán, Christy	72185746	christymunoz229@gmail.com
Bocanegra Dediós, William	43777168	bocanegrawvet@gmail.com

**7. FIRMAS DE LOS MIEMBROS DEL JURADO**


Blgo. Mg Sonia Yenny Calle Espinoza
PRESIDENTE

		
MV. Mg. Juan José, Siuce Moreno	MV. Esp. Diego Díaz Coahila	MV. Ysaac Rubén Chipayo Gonzáles
Apellidos y Nombres	Apellidos y Nombres	Apellidos y Nombres
ASESOR DE LA TESIS	MIEMBRO JURADO	MIEMBRO JURADO